



REABILITAÇÃO DA ÁREA MINEIRA DE SÃO DOMINGOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE CORRECTIVOS E A RESPOSTA FISIOLÓGICA DE *Cistus salviifolius* L. NOS DIFERENTES TRATAMENTOS APLICADOS

Sara Pereira Agostinho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientador: Professora Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu

Co-orientador: Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Júri:

Presidente: Doutora Elizabeth Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora
Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de
Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu, Professora Catedrática do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar da Universidade de
Aveiro;

Mestre Erika da Silva dos Santos, Professora Assistente do Instituto Superior D.
Afonso III, na qualidade de especialista;

Doutora Luísa Cristina dos Mártires Ferreira Carvalho.

Lisboa, 2013

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Manuela Abreu e ao Professor Doutor Jorge Saraiva, pela oportunidade de fazer parte de um projecto desta natureza.

À Professora Doutora Luísa Carvalho e à Mestre Erika Santos, por toda a ajuda e disponibilidade que demonstraram dentro e fora do laboratório, bem como no esclarecimento das dúvidas mais básicas que poderei ter tido.

No ISA, ao senhor Correia pelo apoio, dedicação e ajuda no laboratório e no horto. À Rafaela do Laboratório de Química e ao Miguel do Laboratório 10, pela análise de algumas amostras.

Em Aveiro, quero também agradecer ao grupo da alta pressão, Mauro Santos, Fabiana Vieira, Sílvia Sousa, Rui Queirós e Marise, mas especialmente à Liliana Fidalgo pela orientação e ânimo nos momentos mais difíceis em que as enzimas não colaboravam.

À Mestre Ana Quitério pela preciosa ajuda no mundo da estatística e à Eng^a Maria Antónia Macedo pela cooperação durante o estágio.

Ao Jorge Flora, Filomena e Rita Gonçalves, a minha “família” em Aveiro, por todo o apoio e principalmente por me terem feito sentir em casa.

À Ana Moraes e ao Tiago Ragna pela ajuda que dispensaram no laboratório.

Embora tenha partido cedo demais e inesperadamente, ao meu gato Van Gogh pelas horas de companhia deitado na secretária.

À minha Família e Amigos pelo constante apoio e encorajamento e pela confiança depositada na conclusão desta dissertação.

Acima de tudo quero agradecer a todos os que directa ou indirectamente participaram neste projecto. Muito obrigada!

Resumo

A Mina de S. Domingos está inserida na Faixa Piritosa Ibérica, um dos mais antigos distritos mineiros na Europa que possui uma das maiores concentrações de jazigos de sulfuretos maciços polimetálicos.

Este trabalho tem como objectivo estudar a fitoestabilização de solos desenvolvidos sobre escombreira (*gossan*) da Mina de S. Domingos, utilizando correctivos orgânicos e inorgânicos e *Cistus salviifolius* L. (espécie autóctone adaptada a ambientes extremos). Foram utilizados os seguintes correctivos: cinza de biomassa (2,5 g/kg de solo), mistura de resíduos orgânicos (M.O., 120 g/kg de solo) e mistura de ambos.

O solo apresenta pH muito ácido (3,44 – 3,54), concentrações totais elevadas de elementos potencialmente tóxicos, As, Cu e Pb, e baixa concentração de C orgânico. A fracção disponível do Al, Ca, Fe, K e Mg, é no geral < 8,4 % da concentração total. Quanto aos elementos químicos potencialmente tóxicos, a fracção disponível de As, Cu, Pb e Zn é < 4,27 %. Porém, a fracção disponível de V encontra-se entre 8,0 e 8,3 % do total e a de Mn entre 21,2 e 24,8 %.

O melhor desenvolvimento vegetativo ocorreu nos ensaios com M.O e na mistura cinza+M.O.. Esta espécie não é acumuladora de nenhum elemento químico potencialmente tóxico para o desenvolvimento da planta. Na actividade da Catalase (CAT), verificou-se maior actividade no tratamento M.O. na fracção solúvel da parte aérea, e na fracção ionicamente ligada no tratamento cinza+M.O. nas raízes. Quanto à actividade da Peroxidase (POD), na fracção solúvel é ligeiramente mais elevada nas raízes, e na fracção iónica apresenta valores elevados quer na parte aérea quer nas raízes.

A aplicação de correctivos permitiu um melhor desenvolvimento do *C. salviifolius* e diminui a concentração de elementos químicos na fracção disponível do solo.

Palavras-chave: *Cistus salviifolius* L., fitoestabilização, área mineira, Mina de S. Domingos, correctivos, solos ácidos.

Abstract

The S. Domingos mine is included in the Iberian Pyrite Belt, one of the oldest mining districts in Europe that has one of the largest concentrations of polymetallic massive sulfide deposits.

This work aims to study the soil phytostabilization of heap (*gossan*) from S. Domingos mine, using soil improvers (organic and inorganic) and *Cistus salviifolius* L. (autochthonous species adapted to extreme environments). The amendments used were: biomass ash (2.5 g/kg of the soil), mixture of organic waste (O.M., 120 soil g/kg) and mixture of both.

The soil has very acid pH (3,44-3,54), high total concentrations of potentially toxic elements, As, Cu and Pb, and low concentration of organic C. The soil available fraction of elements, Al, Ca, Fe, K e Mg, is, in generally, < 8,4 % of their total concentration in soil. The soil available fraction of As, Cu, Mo, Pb and Zn is < 4,3 % of the total, but for V it lies between 8,0 and 8,3 % of the total and for Mn it lies between 21,2 and 24,8 %.

The best vegetative development and without visible signs of toxicity, occurred in the treatments with O.M. and cinza+O.M.. The plants are not accumulators of potentially toxic elements.

It was observed high activity in the O.M. treatment of the soluble fraction and the ionically bound fraction in the ash+O.M. treatment in roots, in the Catalase (CAT) activity. As for the activity of Peroxidase (POD), the soluble fraction is slightly higher in roots than in shoots, and the ionically bounded fraction has high values both in shoots and roots.

The application of amendments enables a better development of *C. salviifolius* and decreases the concentration of chemicals in the soil.

Keywords: *Cistus salviifolius* L., phytostabilization, mining area, S. Domingos mine, soil improvers, very acid soil.

Extended Abstract

The abandoned mine of S. Domingos is located in the Iberian Pyrite Belt, which is considered one of the largest concentrations of polymetallic massive sulfides deposits in Europe (Matos e Martins, 2006a). The absence of vegetation in some areas of the mine is a consequence of the type of waste materials produced by mining and acid mine drainage, which is related to methods of sulfide processing and the control of acidic water that runs through a vast net system, affecting not only the mining area but the entire surrounding soils and waters. The oxidation process of sulfides generates acid drainage (pH lower than three) and releases large amounts of sulfates and chemical elements into the environment (Abreu *et al.*, 2010; Matos e Martins, 2006a).

Heaps are considered to be extreme environments, since they possess high concentrations of hazardous chemical elements (Abreu *et al.*, 2009a). When the presence of hazardous elements is combined with adverse physical characteristics and a low content in organic matter and nutrients, they inhibit or reduce the plant's development and the biodiversity of the site (Abreu e Magalhães, 2009). The transfer of chemical elements among the different components of the soil may be considered the main process in controlling their behaviour, mobility and availability (Kabata-Pendias, 2004).

The plants which grow in these degraded environments may contribute to minimize the negative impacts both in chemical terms and the landscape quality. The *Cistus salviifolius* L. is one of the species that tolerate high concentrations of chemical elements considered hazardous for the development of organisms (Abreu *et al.*, 2012a). The concentration of chemical elements in plants may be a result of the availability of the elements in the soil and the absorption capacity of the plant (Bourrelier *et al.*, 1998; Odjegba e Fasidi, 2004; Varennes, 2003).

In plants, toxicity due to high concentrations of potentially toxic elements can impair physiological processes such as a reduction of photosynthesis and of the content change in water available, among others (Bourrelier *et al.*, 1998). Another factor that can contribute to a differential response of plants to substrate contaminants is the soil pH. This affects the growth of plants because of its influence on the mobility of chemical elements (Wong, 2003). Thus, the acid mine waters of S. Domingos may have an important role on the mobilization of the hazardous chemical elements that may affect adjacent soils as well as superficial waters and, eventually, underground waters.

The goal of this work was to improve the characteristics of a mine soil, more specifically its quality in terms of nutrition, as well as to decrease the availability of the elements potentially toxic to the ecosystems through the application of soil amendments. The

physiological response of *C. salviifolius* to the chemical contaminants in the soil was also studied, as well as the influence of soil amendments applied to the soil.

Two types of soil amendments were used: an inorganic and an organic. The inorganic amendment consists of vegetal biomass ash at a concentration of 2,5 g/kg from the Huelva's Thermoelectric Power Plant. The organic amendment is composed of a mixture of wastes at a rate of 120 g/kg, in proportion 1: 1: 1 containing residues from the distillation of carob liquor, a mixture of agricultural waste (substrate used in the cultivation of strawberries + remaining of strawberry plants 3:2 *m/m*) and rockwool used in the cultivation of strawberries. Finally, the two amendments were combined, and in the same concentration previously defined.

The soil has very acid pH (3,44-3,54), high concentrations of potentially toxic elements and low concentration of organic C. The soil available fraction of these elements is, in generally, < 8,4 % of their total concentration in soil. The soil available fraction of As, Cu, Mo, Pb and Zn is < 4,3 % of the total, but for V it lies between 8,0 and 8,3 % of the total and for Mn it lies between 21,2 and 24,8 %.

All amendments improved the plant vegetative development when compared with the control treatment. However, the treatments that contain organic matter (O.M. and ash+O.M. mixture) were the best and the treatment with ash showed a small biomass increase when compared to the control. Plants did not present visible signs of toxicity. This species is not accumulator of potentially toxic chemical elements. The plants from the treatment where ash+O.M. mixture was applied showed the higher concentration of chlorophyll *a* and *b*. However, for carotenes there were no significant differences between the treatments. The Glutathione (GSH) concentration in the shoot was higher in the plants from treatment ash+O.M. but in the roots it was higher in the treatment with ash. The concentration of Total Ascorbate and Peroxide was higher in the treatment with ash, both in the shoots and in the roots. An increase of Catalase (CAT) activity in the soluble fraction was observed, both in the shoots and in the roots of the plants from O.M. and ash+O.M. treatments, respectively. The activity of the ionically bound fraction of CAT was higher in the plant shoots from the treatment O.M. and in the plant roots from the treatment ash. Peroxidase (POD) activity was higher in the soluble fraction in the shoots of plants from the ash treatment and in the roots it was higher in plants from the ash+O.M. treatment. The ionically bound fraction activity of POD was greater in the the shoots of the O.M. treatment whereas in the roots it was higher in plants from the ash treatment. According to the obtained results, the treatments that, in general, most improved the soil characteristics and *C. salviifolius* development were the O.M. and the ash+O.M. treatments.

Currently in Portugal there are no efficient and appropriate programs for the environmental recovery of former mining areas. The soil phytoremediation techniques are

based on removing, transferring and stabilizing the soil pollutants. Phytostabilization is a technique that is less aggressive to the environment because it reduces the risk of contaminants dispersion. The combination of the application of amendments with the use of a technology like phytostabilization, which takes advantage of the natural ability of plants to absorb, accumulate and/or immobilize chemical elements, is an innovation in the field of remediation of contaminated soils.

The choice of any kind of technology depends on the nature of the contaminants, the characteristics of the location and the extent of contamination (Adriano *et al.*, 1998). Since the extent of the contamination in the S. Domingos mine is high and *C. salviifolius* is a relatively abundant indigenous species, the application of amendments rich in organic matter, in this case specific O.M. or ash+O.M., will allow a better development of the *C. salviifolius* and will decrease the available fraction of the majority of the chemical elements in the soil, thus being an option that is economically viable and more accepted by the population.

Índice

1	Introdução.....	1
2	Revisão bibliográfica	3
2.1	Actividade mineira	3
2.2	Toxicidade dos elementos químicos.....	4
2.2.1	Disponibilidade dos elementos químicos.....	5
2.3	Remediação de solos.....	5
2.3.1	Técnicas físico-químicas	5
2.3.2	Fitoremediação	6
2.3.3	Correctivos.....	10
2.4	<i>Cistus salviifolius</i> L.....	11
3	Materiais e métodos.....	13
3.1	Materiais	13
3.2	Metodologia e amostragem	14
3.2.1	Parte aérea (PA)	16
3.2.2	Raízes.....	16
3.2.3	Solo com diferentes tratamentos.....	16
3.3	Análises realizadas	17
3.3.1	Cinzas	17
3.3.2	Resíduos.....	17
3.3.3	Solo.....	18
3.3.4	Solo dos diferentes tratamentos (1ª amostragem e 2ª Amostragem).....	18
3.3.5	Material vegetal.....	19
3.3.6	Análise de dados.....	24
4	Resultados e Discussão	25
4.1	Caracterização dos resíduos e do solo.....	25
4.1.1	Caracterização	25
4.1.2	Análise química multielementar.....	26
4.2	Caracterização das amostras provenientes dos ensaios experimentais	27
4.2.1	Caracterização química.....	27
4.2.2	Fracção extraível dos elementos químicos.....	30
4.3	Caracterização do material vegetal	34
4.3.1	Percentagem de germinação	34
4.3.2	Massa fresca total da parte aérea e das raízes no fim do ensaio	34

4.3.3	Percentagem de água nas plantas no fim do ensaio	35
4.3.4	Quantificação de elementos químicos nas folhas e nas raízes.....	36
4.3.5	Coeficiente de translocação	40
4.3.6	Coeficiente de acumulação	41
4.3.7	Coeficiente de bioacumulação	42
4.3.8	Quantificação de clorofilas e carotenóides	43
4.3.9	Quantificação de glutathionas, ascorbatos e peróxidos.....	45
4.3.10	Quantificação de actividade enzimática de Catalase e Peroxidase	49
5	Conclusões.....	53
6	Referências Bibliográficas	57

Lista de quadros

Quadro 2.1 - Tecnologias físico-químicas disponíveis para remediação de áreas contaminadas por metais (adaptado de Khan <i>et al</i> , 2004).....	6
Quadro 2.2 - Processos de remediação do solo (adaptado de Pulford e Watson, 2003; Cruces, 2008).....	8
Quadro 3.1 - Resumo das características de <i>Cistus salviifolius</i> L. (adaptado de Baslar <i>et al.</i> , 2001; Cabezudo <i>et al.</i> , 1992; UTAD – Jardim Botânico).....	12
Quadro 4.1 - Valores (Média \pm DP, n=3, excepto cinza n=1) do pH, condutividade eléctrica, C total, C orgânico, P extraível, K extraível e N total do solo inicial desenvolvido sobre a escombreira de <i>gossan</i> , da cinza e dos restantes resíduos usados.	26
Quadro 4.2 - Concentrações totais dos elementos químicos dos resíduos (Média, n=1) e do solo inicial (Média \pm DP, n=3) (mg/kg)	27
Quadro 4.3 - Valores (Média \pm DP) do pH, condutividade eléctrica (CE), C orgânico, P extraível, K extraível e N total da 1ª amostragem (após um mês de incubação) (n=4) e da 2ª Amostragem (n=4) nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza + M.O.)	28
Quadro 4.4 - Concentração (Média \pm DP, n=4) dos elementos químicos extraíveis com solução Rhizzo nas amostras de solo colhidas após um mês de incubação (1ª amostragem) e no final do ensaio nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) (mg/kg).....	31
Quadro 4.5 - Valores (Média \pm DP) da concentração dos elementos químicos nas folhas e raízes de <i>Cistus salviifolius</i> nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) expressos em mg/kg massa seca, no final do ensaio (n = 4, excepto tratamento controlo e tratamento cinza n=1, para o branco e para o padrão n=3)	36
Quadro 4.6 - Coeficiente de translocação dos elementos químicos no <i>Cistus salviifolius</i> nos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O.	40
Quadro 4.7 - Coeficiente de acumulação dos elementos químicos no <i>Cistus salviifolius</i> nos tratamentos controlo, cinza, M.O. e cinza+M.O.	42
Quadro 4.8 - Coeficiente de bioacumulação dos elementos químicos no <i>Cistus salviifolius</i> nos tratamentos controlo, cinza, M.O. e cinza+M.O. (n = 4, excepto tratamento controlo e cinza n = 1)	43

Lista de figuras

Figura 4.1 - Percentagem de germinação (Média \pm DP, n=4) do <i>Cistus salviifolius</i> nos diferentes tipos de tratamento (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) após a 2ª sementeira em 2011. Nota: letras diferentes indicam diferenças significativas	34
Figura 4.2 - Massa fresca total (Média \pm DP, n=4) da parte aérea e das raízes do <i>Cistus salviifolius</i> nos diferentes tratamentos no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas.....	35
Figura 4.3 - Percentagem (Média \pm DP, n=4) água nas plantas de <i>C. salviifolius</i>) no fim do ensaio, nos diversos tratamentos aplicados. Letras diferentes indicam diferenças significativas.....	35
Figura 4.5 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de clorofila a, clorofila b e clorofila total nas folhas de <i>Cistus salviifolius</i> nos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas (letras dentro das caixas correspondem à clorofila a ou b; letras fora das caixas correspondem à clorofila total)	44
Figura 4.6 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Carotenóides nas folhas de <i>Cistus salviifolius</i> nos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas.	45
Figura 4.7 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Glutathionas (GSH) nas folhas e nas raízes de <i>Cistus salviifolius</i> dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas	46
Figura 4.8 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Ascorbato total nas folhas e raízes de <i>Cistus salviifolius</i> dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas	47
Figura 4.9 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Peróxidos na parte aérea e raízes de <i>Cistus salviifolius</i> dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas	48
Figura 4.10 - Actividade enzimática (Média \pm DP, n=4) de Catalase (CAT) nas folhas e raízes de <i>Cistus salviifolius</i> dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas.....	50
Figura 4.11 - Actividade enzimática (Média \pm DP, n=4) de Peroxidase (POD) nas folhas e raízes de <i>Cistus salviifolius</i> dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas.....	51

Lista de abreviaturas

AsA Total – ascorbato total

CA – coeficiente de acumulação

CAT – catalase

CB – coeficiente de bioacumulação

FPI – Faixa Piritosa Ibérica

GSH – glutationas reduzidas

ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

INAA – Instrumental Neutron Activation Analysis

M.O. – matéria orgânica

NPK – concentração de azoto, fósforo e potássio

PA – parte aérea

POD – peroxidase

O.M. – organic matter

R - raízes

ZSP – Zona Sul Portuguesa

1 Introdução

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI) constitui uma vasta área geográfica, localizada no sul da Península Ibérica, sendo um dos maiores distritos mineiros de sulfuretos da Europa. A mina de S. Domingos é uma das muitas explorações mineiras situadas na FPI. Com o encerramento da actividade extractiva, a corta de S. Domingos, local onde ocorria a exploração, foi progressivamente inundada por águas ácidas com pH inferior a 2,5 – 3. Em torno da cavidade é possível observar vários tipos de escombreyras constituídas por materiais diversos acumulados ao longo do tempo, tais como escórias modernas de cor negra, escórias romanas acastanhadas, fragmentos de *gossan* de cor avermelhada e rochas encaixantes da mineralização, como vulcanitos e xistos (Matos e Martins, 2006a). Além disso, ao longo da área mineira são visíveis inúmeras escombreyras com volumetria considerável. Em certos locais da Mina, é possível encontrar amplas áreas que não possuem vegetação. Esta é uma consequência da drenagem ácida mineira, a qual está relacionada com os métodos de processamento dos sulfuretos e com o controlo de águas ácidas que percorrem um vasto sistema de canais.

“A inexistência de políticas protectoras do ambiente aquando do processo de encerramento, traduz-se actualmente, numa pesada herança reflectida na presença de grande volume de escombreyras com teores elevados em metais como cobre, chumbo, zinco, ferro, arsénio e antimónio.” (Matos e Martins, 2006a)

A lixiviação dos materiais das escombreyras provoca um impacte negativo na Ribeira de S. Domingos, principalmente devido ao pH ácido (< 3) e à elevada condutividade e elevada concentração em elementos químicos potencialmente tóxicos para os organismos (Abreu *et al.*, 2010; Matos e Martins, 2006a). O impacte das actividades mineiras, não afecta apenas a zona da exploração mas toda a sua envolvente (Abreu e Magalhães, 2009; Abreu *et al.*, 2010; Abreu *et al.*, 2012a). Porém, estas condições ambientais adversas e atípicas permitem que várias espécies de plantas (*Erica andevalensis* Cabezudo e Rivera, *Cistus ladanifer* L., *Cistus salviifolius* L.), animais (microvertebrados) e microorganismos (arqueobactérias) se adaptem e desenvolvam nestas áreas (Abreu e Magalhães, 2009; Matos e Martins, 2006b).

As plantas que se desenvolvem nestes ambientes degradados podem contribuir para a minimização dos impactes negativos quer de natureza química, quer física e paisagista (Abreu *et al.*, 2009a). Deste modo, é importante estudar as espécies tolerantes, como o *Cistus salviifolius*, em áreas de actividade mineira, pois poderão ser utilizadas para gerir e reabilitar ambientes que correspondem a focos de contaminação ambiental, como a Mina de S. Domingos. O *Cistus salviifolius* desenvolveu um conjunto de capacidades adaptativas, ou

seja, desenvolveu um conjunto de estratégias que lhes permitem tolerar elevadas concentrações de elementos químicos considerados gravosos para o desenvolvimento dos organismos (Abreu *et al.*, 2012a).

O presente trabalho tem como principal objectivo estudar a eficiência fitoestabilização de um solo desenvolvido sobre materiais de escombreira (*gossan*), utilizando correctivos juntamente com plantas autóctones e adaptadas a ambientes extremos (*Cistus salviifolius* L.).

Sendo a escombreira sobre a qual se desenvolveu o solo, pobre em nutrientes, foram aplicados diferentes correctivos com o objectivo de melhorar as características físicas e químicas do solo. Os correctivos utilizados foram cinza de biomassa e matéria orgânica separadamente e em conjunto.

Outro objectivo, foi o estudo das respostas fisiológicas do *C. salviifolius* aos elementos químicos contaminantes existentes no solo, resultantes da actividade mineira e dos correctivos aplicados ao solo.

A seguir, descreve-se brevemente a estrutura da tese de modo a facilitar a sua leitura e compreensão. No **Capítulo 2**, inclui-se a revisão bibliográfica sobre o tema estudado. Os materiais e métodos utilizados encontram-se no **Capítulo 3**, onde é feita uma descrição detalhada dos materiais (solo derivado da escombreira, resíduos e *C. salviifolius*), seguida da metodologia da montagem do ensaio e das análises realizadas. No **Capítulo 4**, incluem-se os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. As conclusões descrevem-se no **Capítulo 5** e as referências bibliográficas compilam-se no **Capítulo 6**.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Actividade mineira

A actividade mineira, tanto a céu aberto como em lavra subterrânea, é uma fonte de poluição do ambiente.

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI) é um dos mais antigos distritos mineiros na Europa e, a nível mundial, uma das maiores concentrações de jazigos de sulfuretos maciços, localizados no sector Sudoeste da Península Ibérica (Matos e Martins, 2006a). Está integrada na Zona Sul Portuguesa (ZSP), a qual se estende por cerca de 250 km, desde o Litoral Sul de Portugal até à região da Andaluzia no Sul de Espanha (Matos e Martins, 2006a).

As minas Portuguesas que se encontram na FPI são: Caveira, Lousal, Aljustrel, Neves Corvo, São Domingos, Montinho, Chança, Cercal, Ferragudo, Balança, Lagoas do Paço, Juliana, Barrigão, Brananes, Ferrarias, Furnazinhas, Castro Verde e Corte Pereiras (Abreu *et al.*, 2010). Porém, a maioria destas minas foram encerradas sem que fossem implementadas medidas de prevenção/minimização da poluição e dos impactes ambientais (Santos *et al.*, 2011). Como resultado do abandono das minas, encontram-se escomboreiras resultantes dos processos de extracção e inerentes ao minério, as quais são portadoras de elementos químicos potencialmente tóxicos, em concentração elevada, podendo ser fonte de contaminação ambiental, particularmente, metais pesados e metalóides (Abreu *et al.*, 2009a). A Drenagem Ácida Mineira (DAM) resulta da oxidação dos sulfuretos presentes em rochas/resíduos em função da interacção ar-água-sulfuretos. No processo de oxidação dá-se a libertação para o meio de elevadas quantidades de sulfatos e elementos químicos diminuindo o pH para valores inferiores a três (Abreu *et al.*, 2010).

Actualmente em Portugal, ainda não existem programas de manutenção eficientes e adequados para a recuperação ambiental de antigas áreas mineiras degradadas. No entanto, estão definidas algumas políticas de desenvolvimento sustentável, tais como: a extracção de minérios, a prospecção de jazigos metálicos, a recuperação ambiental de áreas mineiras afectadas por drenagem ácida e a dinamização do turismo temático geológico e mineiro (Matos e Martins, 2006b).

A mina de S. Domingos é um local singular, pois é um dos mais emblemáticos depósitos de sulfuretos de Portugal. A actividade extractiva de S. Domingos consistia na exploração intensa de Ag e Cu (Alves, 1998; Matos e Martins, 2006b) numa única corta, designação para a exploração a céu aberto das camadas mais próximas da superfície, a qual foi iniciada em 1867 com cerca de 120 m de profundidade e com uma rede de galerias e poços que se desenvolveu até cerca de 420 m em lavra subterrânea (Alves, 1998; Matos e Martins, 2006b). Os métodos de exploração subterrânea utilizados foram os de câmaras e

pilares e de corte e enchimento (*cut and fill*) (Alves, 1998; Matos e Martins, 2006b). Com o encerramento da actividade mineira, a corta de S. Domingos foi progressivamente inundada por águas ácidas com pH inferior a três. Como consequência, é possível observar em torno da cavidade vários tipos de escombreyras constituídas por diversos materiais e de cores diferentes (Matos e Martins, 2006b).

2.2 Toxicidade dos elementos químicos

Todos os solos são sistemas complexos que resultam da interacção de três fases: sólida, líquida e gasosa (Kabata-Pendias, 2004; Varennes, 2003). A fase sólida do solo, designada por matriz, é constituída por diferentes organismos, materiais sólidos, orgânicos ou minerais, que formam um sistema poroso. Sendo o solo um sistema poroso, a fase líquida e gasosa partilham os poros existentes. A fase líquida é composta pela água do solo e a fase gasosa é a atmosfera do solo (Varennes, 2003).

A associação de elementos químicos aos componentes sólidos do solo depende das características do elemento bem como das reacções que podem ocorrer entre ambos, tais como a complexação, a troca iónica e a adsorção (Brümmer, 1986).

Os teores de nutrientes necessários às plantas são muito diversos, pois dependem do elemento em questão (Varennes, 2003). São considerados macronutrientes os seguintes elementos: Ca, K, Mg, N, P e S; e micronutrientes: B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni, Se e Zn, fazendo parte do grupo dos elementos vestigiais (Varennes, 2003).

Elementos vestigiais são aqueles que estão presentes em concentrações relativamente baixas nos solos, plantas ou sistemas aquáticos (Abreu *et al.*, 2012a, 2012b; Varennes, 2003). No entanto, podem causar fitotoxicidade dependendo da concentração e da capacidade de tolerância da espécie vegetal (Bourrelier *et al.*, 1998; Odjegba e Fasidi, 2004; Varennes, 2003). Os elementos vestigiais frequentemente associados a problemas de poluição são: Al, As, B, Cd, Cu, Co, Cu, F, Hg, Mn, Mo, Ni, Se e Zn (Varennes, 2003). Mas, elementos vestigiais como o flúor, o selénio, o vanádio ou o iodo não são considerados elementos essenciais, ou seja, não são considerados micronutrientes, mas estão presentes nas plantas (Varennes, 2003).

A redução da fotossíntese, alteração do teor de água e descoloração de folhas são alguns dos efeitos de toxicidade nas plantas (Bourrelier *et al.*, 1998). Porém, a diversidade e actividade dos organismos do solo pode também ser afectada pela toxicidade dos elementos, inibindo a decomposição da matéria orgânica e os processos de mineralização do azoto (Wong, 2003). Outro factor que contribui para que a resposta das plantas aos contaminantes do substrato seja diferente é o pH do solo. Este afecta o crescimento das plantas devido à influência que tem na mobilidade química dos elementos (Wong, 2003). Denota-se assim, a importância que as águas ácidas de S. Domingos podem ter na

mobilização de elementos contaminantes que poderão contaminar os solos/escombreyas adjacentes e as águas superficiais e eventualmente as águas subterrâneas (Santos, 2007).

2.2.1 Disponibilidade dos elementos químicos

A transferência de elementos químicos entre as diferentes fases do solo pode ser considerada como o processo principal no controlo do comportamento, mobilidade e disponibilidade dos mesmos (Kabata-Pendias, 2004).

De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (1992), a concentração de elementos químicos nas plantas resulta da disponibilidade dos elementos no solo e da capacidade de absorção e transferência destes para as diferentes partes da planta através do xilema e do floema.

A disponibilidade dos elementos químicos para as plantas pode ser influenciada por diversos factores que controlam a actividade dos elementos na solução do solo, como o pH, condutividade eléctrica, potencial redox, capacidade de formar complexos de superfície, entre outros (Ernst, 1996). Outros factores que podem influenciar a disponibilidade dos elementos é a presença de bactérias, microfauna, plantas ou fungos que podem modificar as condições físicas e químicas do solo (Ernst, 1996; Bourrelief *et al.*, 1998), assim como o conteúdo e o tipo de matéria orgânica (Brümmer, 1996), a qual pode imobilizar alguns elementos químicos devido à possível presença de agentes quelantes (Alloway, 1990).

2.3 Remediação de solos

Podem ser aplicadas duas práticas na remediação de locais contaminados: *in situ*, prática que consiste na descontaminação no local, a qual requer menor manuseamento, mas a sua aplicação prática é frequentemente mais difícil; e *ex situ*, isto é, há remoção física do solo (escavação) e tratamento nouro local (Ernst, 1996; Varennes, 2003).

De acordo com Adriano *et al.* (1998), a escolha da tecnologia a utilizar depende sempre de três pontos fulcrais: a caracterização do local (dimensão da área a tratar, localização e historial), a caracterização do solo (comportamento dos contaminantes, distribuição destes nas diferentes fracções do solo e a sua disponibilidade) e por último a concentração de elementos químicos contaminantes (estimativa do grau de contaminação e do melhor método de remediação a utilizar).

2.3.1 Técnicas físico-químicas

No Quadro 2.1. encontram-se as diversas técnicas físico-químicas através das quais pode ser realizada a remediação de áreas contaminadas (Khan *et al.*, 2004).

Quadro 2.1 - Tecnologias físico-químicas disponíveis para remediação de áreas contaminadas por metais (adaptado de Khan *et al*, 2004)

Tecnologias	Caracterização
Solidificação	Adição de agentes que agregam os contaminantes às partículas do solo formando misturas duras, não-porosas e não-lixiviáveis.
Tratamento térmico ou volatilização dos poluentes	Aquecimento do solo de modo a permitir a volatilização do elemento.
Lavagem	Lavagem do solo com uma solução ácida ou quelatante.
Lixiviação	Adição de soluções ácidas ou quelatantes de modo a provocar a mobilização ou a indisponibilidade de elementos.
Remoção de componentes do solo	Remoção de partículas finas que são as mais propícias de conter elevadas concentrações de elementos.
Encapsulação	Cobrir o solo com material impermeável.
Electrocinética	Aproveita os processos electroquímicos e electrocinéticos para promover a remoção de metais e de compostos orgânicos.
Incorporação de aditivos ou correctivos no solo	Redução da biodisponibilidade.

As técnicas de remediação acima referidas só são eficientes em pequenas áreas onde é necessária uma descontaminação rápida e completa, para além de possuírem custos elevados (Martin e Bardos, 1996). O custo poderá aumentar, se ocorrer a deslocação de materiais contaminados o que poderá causar riscos de contaminação secundária (Cunningham *et al.*, 1996).

Após o uso destas técnicas é sempre necessário restabelecer o ambiente natural, o que geralmente não é realizado. Assim, a utilização de tecnologias de tratamento de locais contaminados, através de processos físicos e/ou electroquímicos, em áreas mineiras onde existe uma dispersa contaminação polimetálica são mais caros e apenas parcialmente efectivos (Santos, 2007).

2.3.2 Fitoremediação

Áreas mineiras inactivas ou abandonadas são, em geral, locais contaminados, onde é possível encontrar escombreciras, solos, águas e sedimentos que necessitam de processos de recuperação (Abreu e Magalhães, 2009). Considera-se que as escombreciras são

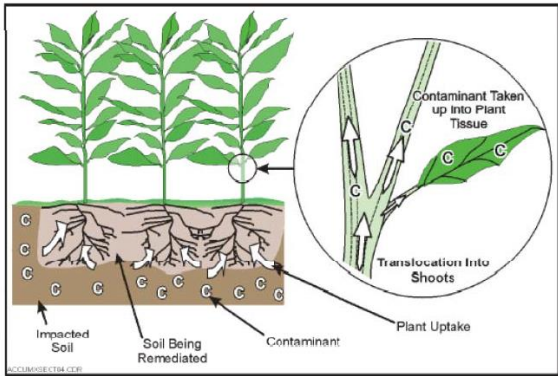
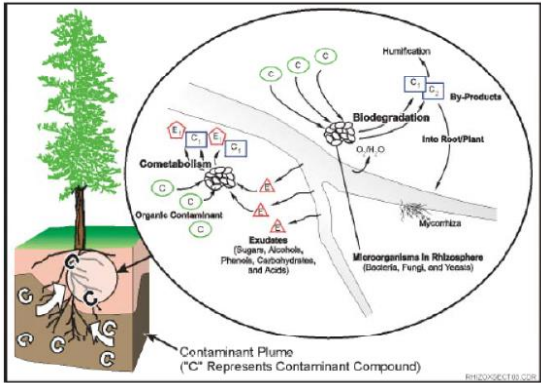
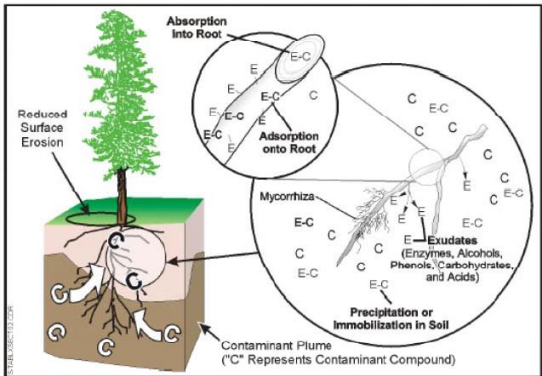
ambientes extremos pois possuem elevadas concentrações de elementos químicos perigosos, que quando combinados com características físicas e baixo conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, inibem ou reduzem o desenvolvimento vegetal e a biodiversidade do local (Abreu e Magalhães, 2009).

É ainda referido por Abreu e Magalhães (2009) que: *“A redução e/ou estabilização da contaminação actual ou potencial, para níveis aceitáveis para o ambiente e para a saúde pública é o principal objectivo dos processos ambientalmente sustentáveis de reabilitação de áreas contaminadas.”*

Não podem ser aplicadas técnicas que promovam a degradação química/bioquímica dos contaminantes para remover os elementos químicos (metais e metalóides), uma vez que estes não podem ser destruídos (Abreu e Magalhães, 2009). Como tal, esse objectivo pode ser alcançado através da redução da mobilidade, da toxicidade e da reactividade dos contaminantes (Wood, 2001). A maioria das estratégias de remediação, em particular as físico-químicas, são dispendiosas e insuficientes. Porém, estas dependem do contaminante, da extensão da contaminação e das estratégias de remediação a aplicar (Arthur *et al.*, 2005; Saier e Trevors, 2008).

As técnicas de fitoremediação do solo baseiam-se em remover, transferir e estabilizar os poluentes dos solos, como se pode verificar no Quadro 2.2 (Cruces, 2008). A escolha de uma destas tecnologias está associada aos contaminantes existentes, local e dimensão da contaminação (Cunningham *et al.*, 1995; Lasat, 2002).

Quadro 2.2 - Processos de remediação do solo (adaptado de Pulford e Watson, 2003; Cruces, 2008)

Processos	Caracterização
<p>Fitoacumulação/Fitoextracção</p> <p>Remoção do contaminante do solo e sua acumulação nos tecidos das plantas.</p>	 <p>(adaptado de Cruces, 2008)</p>
<p>Fitodegradação/Fitotransformação</p>	<p>Degradação de certos contaminantes ou transformação em formas menos tóxicas.</p>
<p>Fitovolatilização</p>	<p>Remoção do contaminante e posterior transformação numa forma volátil.</p>
<p>Rizodegradação</p> <p>Degradação dos contaminantes através da actividade bacteriana ou fúngica que ocorre na rizosfera de certas plantas vasculares.</p>	 <p>(adaptado de Cruces, 2008)</p>
<p>Fitoestabilização</p> <p>Estabilização do meio e minimização da migração de contaminantes.</p>	 <p>(adaptado de Cruces, 2008)</p>

O desenvolvimento natural de plantas em ambientes extremos, como as áreas mineiras, deve-se ao facto de serem plantas que estão adaptadas a ambientes contaminados (Abreu e Magalhães, 2009). Por isso, o aparecimento espontâneo de vegetação nativa nestes ambientes é geralmente baixo. Estas plantas espontâneas

demonstram elevada tolerância a elementos potencialmente tóxicos e a baixos níveis de nutrientes, sendo por isso ideais para a sucessão ecológica (Mendez *et al.*, 2007; Wong, 2003).

Abreu e Magalhães (2009) referem: “*Estas plantas pioneiras possuem uma grande importância nos ciclos biogeoquímicos contribuindo para os processos de formação de solo. Deste modo, a selecção de plantas nativas e espontâneas que crescem em áreas mineiras são a melhor escolha para fins de fitoestabilização, pois geralmente demonstram características não acumulativas*”.

As espécies nativas bem adaptadas na área mineira de S. Domingos são: *Erica andevalensis* Cabezudo e Rivera, *Erica australis* L., espécies da família *Cistaceae*, tais como *Cistus ladanifer* L., *Cistus salviifolius* L., *Cistus crispus* L., *Cistus monspeliensis* L. e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martínez (Abreu e Magalhães, 2009).

A fitoestabilização é uma tecnologia barata, pouco invasiva e mais aceite pelo público, na remediação de solos contaminados e sedimentos. Esta tecnologia permite tratar locais contaminados com elementos químicos, pois tira partido da capacidade natural das plantas em absorver, acumular e/ou imobilizar elementos químicos (Abreu e Magalhães, 2009).

2.3.2.1 Vantagens e limitações da fitoestabilização

A fitoestabilização apresenta diversas vantagens quando comparada com outras técnicas clássicas de remediação. É mais viável nos seguintes aspectos: economicamente e energeticamente eficiente, auto-reguladora, absorve dióxido de carbono e pode ser aplicada para remediar locais que possuam uma contaminação polimetálica (Mench, 2005; Saier e Trevors, 2008). É uma técnica menos agressiva para o ambiente, pois reduz o risco de dispersão de contaminantes (Mench, 2005; Pilon-Smits e Freeman, 2006; Singh *et al.*, 2003). O aumento de matéria orgânica no solo, devido à presença da planta, melhora a fertilidade do solo e contribui para a restauração dos ecossistemas (Mench, 2005; Mendez *et al.*, 2007). A biomassa pode possuir um elevado potencial, pode ser utilizada para diversos fins, tais como: produção de calor e energia, produção de papel, etc. (Mench, 2005; Saier e Trevors, 2008).

Porém, a fitoestabilização tem algumas limitações. Esta depende das condições climáticas, das características físicas, químicas e mineralógicas dos solos e escomboreiras, bem como efectividade da permanência do correctivo, quando aplicado, que regula o estabelecimento e crescimento da planta (Mench, 2005; Mendez e Maier, 2008a; 2008b; Pilon-Smits e Freeman, 2006).

2.3.3 Correctivos

Segundo Varennes (2003), os correctivos são substâncias que são adicionadas ao solo com a finalidade de modificar ou melhorar algumas das suas propriedades físico-químicas.

2.3.3.1 Correctivos inorgânicos

O ajustamento do pH da camada arável de um solo ácido, de modo a torna-lo mais favorável ao crescimento das plantas é conseguido pela calagem, que consiste na aplicação de produtos alcalinizantes ao solo. Para ser eficiente, um produto alcalinizante tem de se dissolver rapidamente, estando deste modo, dependente da sua superfície específica (Varennes, 2003).

Actualmente são utilizados quase exclusivamente os calcários, os quais são constituídos maioritariamente por carbonato de cálcio (CaCO_3) ou por carbonato de cálcio e magnésio $[(\text{Ca}, \text{Mg})\text{CO}_3]$. Os calcários são relativamente baratos e não são cáusticos, o que facilita a sua aplicação e permite que sejam distribuídos em culturas já instaladas.

Muitos produtos residuais da indústria podem ser utilizados como correctivos alcalinizantes alternativos, como por exemplo, as cinzas da queima de madeira, pó de cimento, algumas escórias e alguns biossólidos (Varennes, 2003). Enquanto que o calcário possui um pH de cerca de 8,2, alguns destes produtos acima mencionados, como as cinzas de madeira, contém óxidos e hidróxidos de cálcio e magnésio e um pH muito mais elevado. No entanto, é necessário tomar precauções quando estes produtos são aplicados para evitar queimaduras no aplicador ou nas plantas (Varennes, 2003).

As cinzas de biomassa vegetal provenientes de Centrais Termoeléctricas, são um exemplo de correctivos inorgânicos que possuem grandes quantidades de nutrientes essenciais às plantas como o potássio, cálcio ou fósforo e pH elevado (APEA, 2013). No caso das cinzas, estas propriedades conferem oportunidades para a correcção da acidez de solos e para a reciclagem de nutrientes, compensando deste modo a extracção de biomassa da floresta para produção de energia (APEA, 2013).

A lã de rocha é outro exemplo de correctivo inorgânico. Esta provém de fibras minerais de rochas vulcânicas, entre elas o basalto e o calcário. É produzida a partir de lã mineral (EcoCasa, sem data). É usualmente utilizada em culturas de hidroponia, onde substitui a utilização de solo.

2.3.3.2 Correctivos orgânicos

Quando o teor de matéria orgânica do solo é baixo, a aplicação de resíduos orgânicos é necessária para assegurar um crescimento vegetativo adequado. Os resíduos orgânicos vão promover a qualidade do solo, porque, segundo Varennes (2003), a maior crescimento vegetativo vai corresponder maior volume radicular, única fonte de carbono orgânico para os organismos do solo. O carbono orgânico presente nas raízes pode representar desde apenas 5 % do total da planta, no caso de algumas hortícolas, até 40 % em culturas perenes com raízes profundas (Varennes, 2003).

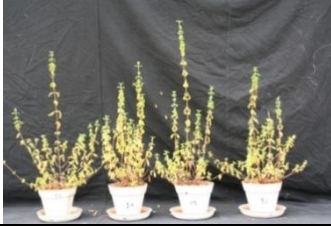



Os resíduos orgânicos fornecem nutrientes às plantas à medida que se mineralizam. Em particular, deve ser recordado que a incorporação de grandes quantidades de resíduos com razão C:N elevada, pode originar uma depressão no nível do azoto mineral, devido à sua imobilização pelos organismos do solo (Varennes, 2003).

Os resíduos agro-industriais são um exemplo de correctivos orgânicos. Estes podem ser subprodutos de destilarias, restos de plantas, substratos de culturas entre outros. A correcção dos solos, recorrendo a correctivos orgânicos, poderá facilitar a revegetalização dos mesmos através do aumento do teor de matéria orgânica e de nutrientes essenciais para as plantas, pH e capacidade de retenção de água, bem como conversão dos metais/metaloídes em formas menos biodisponíveis (Alvarenga *et al.*, 2011).

2.4 ***Cistus salviifolius* L.**

O *Cistus salviifolius* L. é um arbusto Mediterrânico distribuído por toda a bacia do Mediterrâneo, como em Marrocos, Argélia, Sudoeste de França e Península Ibérica, ocorrendo numa ampla gama de ambientes (Abreu *et al.*, 2012a). Em Portugal pode encontrar-se em todo o território continental, com excepção do Noroeste e só esporadicamente na faixa litoral a Norte do Cabo da Roca. No Quadro 2.3 encontra-se uma breve descrição das características de *Cistus salviifolius* L..

Quadro 2.3 - Resumo das características de *Cistus salvifolius* L. (adaptado de Baslar *et al.*, 2001; Cabezudo *et al.*, 1992; UTAD – Jardim Botânico)

Família	<i>Cistaceae</i>
Distribuição geográfica	Toda a bacia do Mediterrâneo e norte da Europa.
Nome comum	Estevinha, Sanganho-manso, Sanganho-mouro, Sargaço, Sargaço-manso, Sargaço-mouro.
Caducidade	Perene.
Porte Arbusto pequeno (até cerca de 1 m) muito ramificado.	
Folhas Verdes escuras, pecioladas, rugosas e ovadas raramente com tamanho superior a 2 cm.	
Raízes Castanhas avermelhadas.	
Estrutura reprodutiva Flores organizadas em cimeiras apicais paucifloras; cálice e corola pentâmeros; corola branca.	 (Retirado de http://www.cepolina.com/cistus_salvifolius_flower_petal.html)
Floração	Início de Abril
Frutos	Fins de Julho – Início de Agosto
Usos e costumes	Combate à erosão hídrica.
Habitat e ecologia	Habitat muito amplo, frequentemente em rochas ácidas, pinhais, montados e prados.

3 Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no Horto e nos Laboratórios de Biotecnologia e Geoquímica do Instituto Superior de Agronomia, nos Laboratórios Tecnológicos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e no Laboratório de Edafologia Y Química Agrícola da Universidade de Santiago de Compostela.

3.1 Materiais

O ensaio realizado consistiu na incorporação de diferentes resíduos num solo muito incipiente desenvolvido sobre materiais de escombreira de *gossan* da área mineira de S. Domingos, bem como na análise do desenvolvimento e comportamento do *Cistus salviifolius* L. mediante os diferentes tipos de correctivos (solo com resíduo incorporado) utilizados. Deste modo, os materiais utilizados neste ensaio foram: solo desenvolvido sobre escombreira de *gossan*; resíduos orgânicos e inorgânicos e sementes de *C.salviifolius*. Todos os materiais utilizados (solo, resíduos e sementes) foram colhidos em 2010 na área de S. Domingos.

Amostra de Solo

A amostra compósita de solo foi colhida na área mineira de S. Domingos e crivada a 10 mm no local de amostragem. Seguidamente, foi seca ao ar.

Resíduos

A combinação de dois correctivos, orgânico e inorgânico, permite testar se a mistura complementa um maior número de necessidades, tanto do solo como do *Cistus salviifolius*, do que aplicando os correctivos separadamente. Os resíduos utilizados foram cinza de biomassa, bagaço da destilação do licor de alfarroba; os resíduos agrícolas (substrato para o cultivo do morangueiro+ restos de plantas) e a lâ de rocha usada no cultivo do morangueiro. A combinação de dois correctivos, orgânico e inorgânico, permitiu testar se a mistura complementa um maior número de necessidades, tanto do solo como do *Cistus salviifolius*, do que aplicando os correctivos separadamente. Por outro lado, a selecção destes resíduos, prende-se com o facto de estes existirem em quantidades consideráveis e a uma distância relativamente perto da mina de S. Domingos, o que aumenta a sustentabilidade do tratamento do local. Deste modo, os resíduos tiveram como proveniência a Central Termoeléctrica de Huelva (conza de biomassa), destilarias locais do interior Algarvio e da produção agrícola da Hubel.

***Cistus salviifolius* L.**

As sementes de *C. salviifolius* foram obtidas através da recolha das cápsulas na área mineira de S. Domingos. As sementes foram retiradas das cápsulas e conservadas à temperatura ambiente até à data da sua utilização.

3.2 Metodologia e amostragem

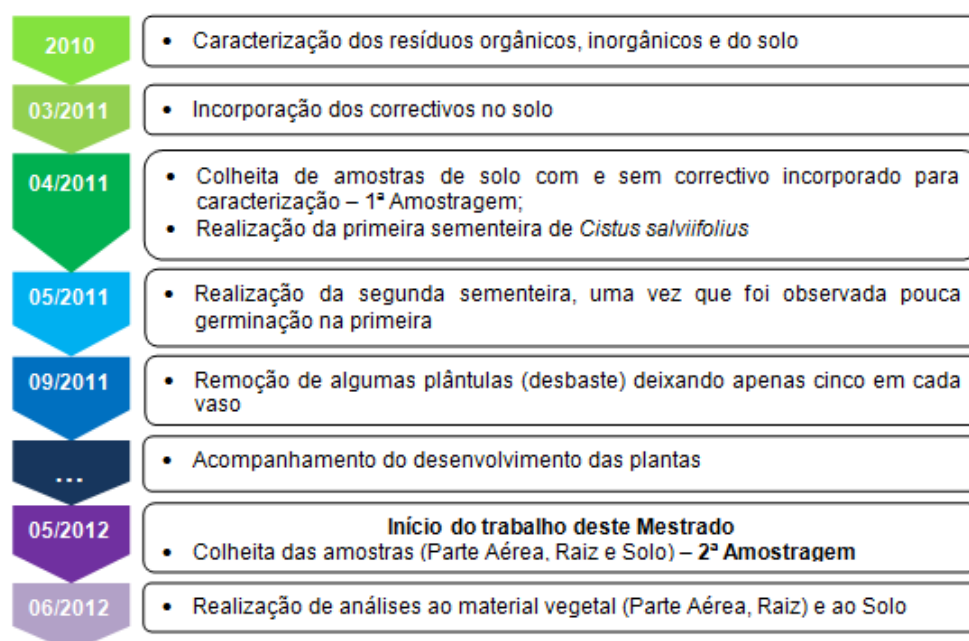
De Novembro de 2011 a finais de Abril de 2012, sob a orientação da Professora Doutora Manuela Abreu, foram conduzidos dois ensaios com *Cistus ladanifer* e *Cistus salviifolius*, os quais não tiveram qualquer sucesso.

Por indicação da minha orientadora, no início do mês de Maio de 2012 iniciei o tema deste Mestrado a partir de um trabalho prático iniciado e desenvolvido pela Mestre Erika Santos, que compreendia os seguintes itens:

- Recolha e caracterização dos materiais usados;
- Montagem do ensaio e acompanhamento do mesmo durante um ano;
- Recolha de amostras de solo dos diferentes tratamentos, após um mês de incubação e realização das respectivas análises;
- Sementeiras e desbaste.

Consequentemente, o trabalho prático deste Mestrado iniciou-se aquando da realização da 2ª Amostragem (Maio 2012) contemplando as análises de solos e plantas desta amostragem (excepto determinação da concentração dos elementos na fracção disponível do solo e nas plantas).

A sequência temporal do ensaio e caracterização das amostras realizou-se da seguinte forma:



Aos resíduos (orgânicos e inorgânicos) e solo inicial foi realizada, antes do início do ensaio, uma análise multielementar bem como a sua caracterização físico-química.

Os resíduos foram usados como correctivos do solo da seguinte forma:

- Cinza de biomassa aplicada a uma concentração de 2,5 g/kg;
- Mistura de resíduos a 120 g/kg, na proporção 1:1:1 contendo bagaço da destilação do licor de alfarroba; mistura de resíduos agrícolas (substrato para o cultivo do morangueiro + restos de plantas 3:2 m/m) e lã de rocha usada no cultivo do morangueiro;
- Mistura de resíduos a 120 g/kg (anteriormente indicada) + cinza a 2,5 g/kg.

A mistura do solo com os diferentes correctivos constituíram os vários tratamentos:

- Controlo (solo): **vasos 1 – 4**;
- Solo+ cinza de biomassa na proporção de 2,5 g/kg de solo: **vasos 5 – 8**;
- Solo+ mistura de resíduos orgânicos (M.O.) a 120 g/kg de solo: **vasos 9 – 12**;
- Solo+ cinza a 2,5 g/kg + mistura de resíduos orgânicos a 120 g/kg (cinza + M.O.): **vasos 13 – 16**.

Todos os correctivos utilizados foram incorporados manualmente no solo. Para cada tratamento foram realizados quatro replicados.

Os solos, já com os correctivos adicionados foram deixados a incubar durante um mês (Março de 2011 a Abril de 2011) a 70 % da capacidade de retenção de água em condições controladas. Após este tempo de incubação (1ª Amostragem), foram retiradas amostras de solo e solo com correctivo (entre 0 – 5 cm), dependendo dos tratamentos, e foram caracterizados os seguintes parâmetros: pH e condutividade eléctrica em água, concentração de carbono orgânico, concentração de azoto total, fósforo e potássio extraíveis e concentração dos elementos químicos na fracção disponível.

Seguidamente, foi realizada a primeira sementeira de *C. salviifolius* que teve início a 14 de Abril de 2011. Foram colocadas, em cada vaso, 0,25 g de sementes, o que equivale aproximadamente a 143 – 151 sementes. Vinte e um dias após a primeira sementeira (Maio de 2011), foi observado que havia pouca germinação. Deste modo, foram colocadas mais 0,30 g de sementes em cada vaso, de modo a garantir a germinação de mais algumas plantas.

Em Setembro de 2011, após cinco meses de crescimento, foram removidas algumas plantas dos vasos, deixando apenas cinco plantas por vaso. Estas cinco plantas deixadas

em cada vaso desenvolveram-se até Maio de 2012, completando aproximadamente um ano de crescimento (2ª Amostragem).

Ainda em Maio de 2012, procedeu-se à avaliação e colheita das amostras vegetais (parte aérea e raiz) e do solo de cada vaso, as quais são descritas seguidamente.

3.2.1 Parte aérea (PA)

Foi medida a altura dos caules principais de cada planta, o qual foi posteriormente cortado junto ao solo. Após o corte da PA, os caules e as folhas foram pesados e lavados, inicialmente com água corrente, e depois passadas duas vezes por água desionizada. Cerca de 3 - 4 g de folhas foram separadas e congeladas em azoto líquido para posterior análise enzimática, de clorofilas, ascorbatos e peróxidos. A restante PA foi colocada numa estufa a 40 °C até atingir massa constante, para posterior quantificação dos elementos químicos.

3.2.2 Raízes

Após ter sido removida a PA, desenformou-se o vaso de modo a retirar as raízes. Estas foram lavadas com água corrente até não haver vestígios de terra, sendo depois passadas por água desionizada. Seguidamente foi utilizado um aparelho de ultrassons, para através da vibração remover algumas partículas de solo que ainda estivessem presentes nas raízes (duas vezes durante 15 minutos). Foram separadas cerca de 2 – 3 g de raízes e congelados em azoto líquido para posterior análise dos parâmetros fisiológicos, excepto a concentração de clorofilas. As restantes amostras de raiz foram colocadas em estufa a 40 °C até atingirem massa constante, para mais tarde serem quantificados os elementos químicos.

As amostras de raiz referentes ao Vaso 4 (controlo), Vaso 5 (cinza) e Vaso 6 (cinza) foram secas na totalidade e as amostras referentes ao Vaso 7 (cinza) e ao Vaso 8 (cinza) foram congeladas na totalidade devido à pouca quantidade de amostra, o que tornava impossível de realizar a quantificação enzimática e a quantificação de elementos em simultâneo. A ausência de repetições deve-se à escassez de material para analisar.

3.2.3 Solo com diferentes tratamentos

Depois de retiradas as raízes, foram crivadas, no estado húmido, cerca de 100 g de solo a 2 mm e o restante solo foi deixado a secar ao ar. Parte do solo crivado foi guardado no frigorífico a 4 °C para posterior análise da fracção disponível dos elementos químicos. O solo restante foi também crivado a 2 mm e seco à temperatura ambiente para posterior análise das restantes características dos solos (pH e condutividade eléctrica em água, concentração de carbono orgânico e NPK).

3.3 Análises realizadas

As análises foram realizadas aos resíduos, ao solo (fracção < 2mm) e ao material vegetal (parte aérea e raiz).

3.3.1 Cinzas

3.3.1.1 Determinação do pH e condutividade eléctrica em água

A determinação do pH e da condutividade eléctrica (EC), foram realizadas no Laboratório de Geoquímica do Ambiente do Instituto Superior de Agronomia. O pH foi determinado numa suspensão solo/água na proporção de 1:2,5, ou seja, 10 g de solo para 25 mL de água. As determinações foram efectuadas com um potenciómetro com eléctrodo de vidro combinado (Póvoas e Barral, 1992).

3.3.1.2 Concentração de C total e do N total

A determinação do C total e do N total foi realizada na Universidade de Santiago de Compostela, no Departamento de Edafologia Y Química Agrícola, através do aparelho de Leco.

3.3.2 Resíduos

3.3.2.1 Determinação do pH e condutividade eléctrica em água

A determinação do pH e da condutividade eléctrica (EC), foram realizadas utilizando o protocolo descrito no ponto 3.3.1.1..

3.3.2.2 Concentração de carbono orgânico

Foram pesados 40 g de solo e secos numa estufa a 40 °C até obter massa constante. A concentração de carbono orgânico analisada através de combustão e detecção por infravermelhos através do método de Combustão por Via Seca – Aparelho de Ströhlein descrito por Póvoas e Barral (1992), no Laboratório 10 do Departamento de Química do Instituto Superior de Agronomia.

3.3.2.3 Concentração de N total e de P e K extraível

O azoto total foi determinado através do método de Kjeldahl e o P e K extraíveis através do método de Égner-Rihem, no Laboratório 10 do Departamento de Química do Instituto Superior de Agronomia.

3.3.2.4 Análise química multielementar

A análise química multielementar ao solo (fracção <2 mm) foi realizada num laboratório certificado, ActivationLaboratories no Canadá, por Espectroscopia Óptica de Emissão de Plasma Indutivamente Acoplado (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES) e por Análise por Activação Instrumental de Neutrões (Instrumental Neutron Activation Analysis, INAA), após digestão ácida das amostras com ácido fluorídrico, ácido nítrico, ácido perclórico e ácido clorídrico (ActivationLaboratories, 2012). O INAA é numa técnica analítica, a qual depende da medição da radiação gama induzida na amostra através da irradiação de neutrões, ou seja, cada elemento activado emite uma “*fingerprint*” de radiação gama que é medida e quantificada (ActivationLaboratories, 2012).

3.3.3 Solo

3.3.3.1 Análise multielementar

A análise química multielementar ao solo foi realizada utilizando o protocolo descrito no ponto 3.3.2.4..

3.3.4 Solo dos diferentes tratamentos (1ª amostragem e 2ª Amostragem)

3.3.4.1 Determinação do pH e condutividade eléctrica em água

A determinação do pH e da condutividade eléctrica (EC), foram realizadas utilizando o protocolo descrito no ponto 3.3.1.1..

3.3.4.2 Concentração de carbono orgânico

Foram pesados 40 g de solo e secos numa estufa a 40 °C até obter massa constante. A concentração de carbono orgânico analisada através de combustão e detecção por infravermelhos através do método de Combustão por Via Seca – Aparelho de Ströhlein descrito por Póvoas e Barral (1992), no Laboratório 10 do Departamento de Química do Instituto Superior de Agronomia.

3.3.4.3 Concentração de N total e de P e K extraível

O azoto total foi determinado através do método de Kjeldahl e o P e K extraíveis através do método de Égner-Rihem, no Laboratório 10 do Departamento de Química do Instituto Superior de Agronomia.

3.3.4.4 Determinação da fracção disponível de elementos químicos

A determinação da fracção disponível de elementos químicos foi realizada segundo o Método Rhizzo (Feng, 2005). Este método simula o ambiente da rizosfera pela componente química dos ácidos usados e pelo pH.

Foram colocadas num tubo de centrífuga, 3,00 g de solo húmido da rizosfera com 20 ml de uma solução composta por: ácido acético, láctico, cítrico, málico e fórmico. A concentração total é de 10 mM e o rácio molar é 4:2:1:1:1. Colocou-se a mistura num agitador durante 16 h e, a seguir, centrifugou-se durante 10 minutos a 3000 g. Retiraram-se 25 ml de sobrenadante para um balão volumétrico de 50 ml e adicionou-se solução de HNO₃ a 2 % até perfazer o volume. Nos extractos obtidos foram posteriormente determinados os elementos químicos (maiores e vestigiais). A determinação da fracção disponível de elementos químicos foi realizada na Universidade de Santiago de Compostela, no Departamento de Edafologia Y Química Agrícola.

3.3.5 Material vegetal

3.3.5.1 Coeficiente de Translocação, Coeficiente de Acumulação e Coeficiente de Bioacumulação

O Coeficiente de Translocação (CT) caracteriza a capacidade de translocação de elementos das raízes para as folhas. O Coeficiente de Acumulação (CA) caracteriza a capacidade de transferência de um elemento do solo para a planta. O Coeficiente de Bioacumulação (CB), é semelhante ao CA, porém é utilizada a fracção disponível do solo validada pela extracção com Solução de Rhizzo. O CT, o CA e o CB são calculados utilizando as equações descritas por Abreu *et al.* (2008, 2012a):

$$CT = \frac{[elementos\ totais\ nas\ folhas]}{[elementos\ totais\ nas\ raízes]}$$

$$CA = \frac{[elementos\ totais\ nas\ folhas]}{[elementos\ totais\ no\ solo]}$$

$$CB = \frac{[elementos\ totais\ nas\ folhas]}{[elementos\ disponíveis\ no\ solo]}$$

3.3.5.2 Extracção de clorofilas e carotenóides

A extracção de clorofilas foi realizada com 2 mL de DMSO (C₂H₆OS) e cerca de 0,2 g de amostra foliar intacta, incubados a 65 °C, durante 1 h (adaptado de Hiscox e Israelstam, 1979). O método não foi ajustado à amostra.

3.3.5.2.1 Quantificação de clorofilas

Após a incubação, foi retirado 1 mL de amostra, extraída de acordo com o protocolo descrito no ponto 3.3.5.2, e a absorvância foi lida a 645 e a 663 nm (adaptado de Hiscox e Israelstam, 1979).

A concentração de clorofila foi calculada utilizando as equações descritas por Porra *et al.* (1989):

$$\text{Chl}_a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 12,00 \times A_{663} - 3,11 \times A_{645}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 20,78 \times A_{645} - 4,88 \times A_{663}$$

$$\text{TotChl (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 17,67 \times A_{645} + 7,12 \times A_{663}$$

e convertidas para mg Chl g⁻¹ PF (Richardson *et al.*, 2002).

3.3.5.2.2 Quantificação de carotenóides

À semelhança do ponto 3.3.5.1.1., foi retirado 1 mL de amostra, extraída de acordo com o protocolo descrito no ponto 3.3.5.1, e a absorvância foi lida a 470 nm.

3.3.5.3 Quantificação de glutathionas, ascorbatos e peróxidos

3.3.5.3.1 Extração

Cada amostra de extracto vegetal foi homogeneizada em 2,5 mL de ácido metafosfórico frio a 6 % (pH 2,8), contendo 1 mM EDTA, na presença de azoto líquido. O homogenato foi centrifugado a 27 000 g durante 15 min a 4 °C, e o extracto obtido foi guardado a -80 °C para posterior análise de glutathionas, ascorbatos e peróxidos. O processo de obtenção do extracto vegetal utilizado foi o mesmo para a análise às glutathionas, ascorbatos e peróxidos. O método não foi ajustado à amostra.

3.3.5.3.2 Quantificação de glutathionas

As fracções de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram analisadas colorimetricamente pelo método descrito por Anderson *et al.* (1992), que consiste no seguinte:

O extracto (80 µL), previamente obtido (ver ponto 3.3.5.3.1), foi diluído em 320 µL de Na₂HPO₄ 5 % (pH 7,5) e posteriormente dividido em duas fracções. A fracção onde se quantificou a GSSG foi incubada durante 1 h a 25 °C com 15 µL de 2-vinylpiridina e a fracção para quantificação de GSH ficou inalterada.

De seguida foram adicionados 400 µL de Reagente 1 (EDTA 15 mM, Ellman 0,3 mM, BSA 0,04 %, Na₂HPO₄.7H₂O 110 mM e NaH₂PO₄.H₂O 40 mM) e 320 µL de Reagente 2 (EDTA 1 mM, imidazole 50 mM e BSA 0,02 %).

Os brancos foram lidos a 412 nm após o que se adicionou 80 µL de NADPH 9.0 mM. A leitura da amostra foi também efectuada a 412 nm, 90 min depois.

As concentrações de GSH e GSSG foram expressas em µmol g⁻¹ peso fresco. A percentagem de redução corresponde à percentagem total de glutatona presente como GSH e é definida como: $GSH / (GSH + GSSG) \times 100$.

Uma vez, que os resultados obtidos para a GSSG (glutatona oxidada) foram inconclusivos, utilizaram-se os valores da GSH (glutatona reduzida).

3.3.5.3.3 *Quantificação de ascorbatos*

As fracções de ascorbato reduzido (AsA) e de ascorbato oxidado (DAsA) foram analisadas colorimetricamente pelo método descrito por Okamura (1980), que seguidamente se descreve:

125 µL do extracto ácido foi neutralizado com 25 µL de trietanolamina 1,5 M. Após a mistura completa, foi adicionado, 50 µL tampão fosfato de sódio 150 mM a pH 7,4. Para a quantificação de ácido ascórbico total foram adicionados 75 µL de DTT 10 mM. A mistura foi incubada a 25 °C durante 15 min para reduzir o DAsA presente no extracto. Para remover o excesso de DTT, adicionaram-se 75 µL de N-etilemaleimida 0,5 (m/V). As amostras foram então misturadas e incubadas durante 30 s a 25 °C. Para a quantificação de AsA, foi adicionada água desionizada, para que os volumes de ambas as amostras fossem iguais. Em ambas as amostras, foram adicionados sucessivamente os seguintes reagentes: 300 µL de ácido tricloroacético 10 (m/V), 300 µL de ácido fosfórico a 44 % (v/v), 300 µL de 2, 2'-dipyridyl a 4 % (m/V) em etanol a 70 % e 150 µL de FeCl₃ a 3 % (m/V). Após a mistura, as amostras foram incubadas durante 1 h a 37 °C. Absorvância foi lida a 525 nm. A concentração da DAsA foi calculada subtraindo-se a concentração de AsA, medida a partir do ascorbato total determinado. As curvas padrão de AsA, na faixa de 10-60 µM, foram preparadas em ácido metafosfórico a 5 %.

Os resultados obtidos para a DAsA (ascorbato oxidado) foram inconclusivos, utilizaram-se os valores da AsA Total (ascorbato total).

3.3.5.3.4 *Quantificação de peróxidos*

A produção de H₂O₂ foi analisada de acordo com o método descrito por Jiang *et al.* (1990), usando a oxidação de Fe²⁺, seguido pela reacção de Fe³⁺ com o xilenol laranja. Este método produz resultados reprodutíveis no intervalo de concentração de H₂O₂ de 0,1 a 1 µM. Para a determinação de H₂O₂ utilizaram-se 150 µL do extracto obtido e foram adicionados 150 µL da mistura de reacção, que contém: sulfato ferroso de amónio 500 µM, ácido sulfúrico 50 mM, xilenol laranja 200 µM e sorbitol 200 mM. Depois de 45 min à temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 560 nm.

3.3.5.4 Extracção de proteínas e quantificação da actividade enzimática

A obtenção do extracto proteico e a quantificação da actividade enzimática foram realizadas nos Laboratórios Tecnológicos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Foi quantificada a actividade da catalase (CAT) e da peroxidase (POD), nas fracções solúvel e iónica.

Foi realizada uma extracção sequencial e as análises enzimáticas foram realizadas em triplicado em cada uma das fracções, nas folhas e nas raízes das plantas. O método usado é uma adaptação baseada no descrito por Pang *et al.* (2003) e Ingham *et al.* (1998) e ajustada a amostras de *Cistus ladanifer* (Santos *et al.*, 2009). O método não foi ajustado à amostra devido a este ter sido adaptado às características de outra espécie do mesmo género (*C. ladanifer*).

3.3.5.4.1 *Extracção da fracção solúvel*

Para a extracção da fracção solúvel foram utilizados 0,5 g de material vegetal (folhas e raízes), liofilizadas e finamente moídas, homogeneizadas em 20 mL de tampão fosfato 0,5 mM (pH 7,2) contendo 1 mM de EDTA, 1 % (*m/V*) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), para garantir que toda a fracção solúvel fosse removida da parede celular. De seguida, o extracto foi incubado durante 15 min a 4 °C, sob agitação contínua. A mistura homogénea foi centrifugada durante 10 min a 22 000 *g* e a 4 °C. O sobrenadante contendo a fracção solúvel das enzimas foi medido, congelado em azoto líquido e armazenado (-20 °C) até à sua quantificação.

3.3.5.4.2 *Extracção da fracção ionicamente ligada*

A extracção da fracção ionicamente ligada foi feita a partir do *pellet* obtido na extracção da fracção solúvel. Ao *pellet* obtido foram acrescentados 20 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), contendo 1 mM de EDTA, 1 % (*m/V*) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e NaCl 1M. De seguida, o extracto foi incubado durante 15 min a 4 °C, sob agitação contínua. A mistura homogénea foi centrifugada durante 10 min a 22000 *g* e a 4 °C. O sobrenadante contendo a fracção ionicamente ligada das enzimas foi medido, congelado em azoto líquido e armazenado (-20 °C) até à sua quantificação.

3.3.5.4.3 *Quantificação da catalase (CAT)*

A quantificação da CAT foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Wong e Whitaker (2003) e Chance and Maehly (1955). A cada 100 µL extracto enzimático foram adicionados, em cuvetes de quartzo: 2 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 150 µL de H₂O₂ 200 mM e 750 µL de água destilada, de modo a perfazer 3 mL. A reacção foi

iniciada após a adição de H_2O_2 . A decomposição do H_2O_2 foi seguida a 240 nm, e foi calculado o declive da porção linear da curva que relaciona a absorvância a 240 nm com o tempo ($\Delta\text{Abs}_{240} \text{ min}^{-1}$). A inclinação calculada foi utilizada para determinar a actividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ peso fresco) utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) para o H_2O_2 de $36,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.5.4.4 *Quantificação da peroxidase (POD)*

A actividade da POD foi quantificada pelo método do guaiacol descrito por Yuan e Jiang (2003) e Chance and Maehly (1955), que consistiu no seguinte: a cada 750 μL de extracto enzimático foram adicionados, em cuvetes de quartzo, 1,2 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 30 μL de H_2O_2 200mM, 200 μL de guaiacol 135 mM e 70 μL de água destilada, de modo a perfazer 3 mL. A reacção foi iniciada após a adição do guaiacol. O aumento de absorvância foi seguido a 420 nm durante 5 min, e foi calculado o declive da porção linear da curva que relaciona a absorvância a 420 nm com o tempo ($\Delta\text{Abs}_{420} \text{ min}^{-1}$). A inclinação calculada foi utilizada para determinar a actividade da POD ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ massa fresca) utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) de $2,60 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a oxidação do guaiacol, tetraguaiacol.

3.3.5.5 Digestão ácida e quantificação de elementos químicos

3.3.5.5.1 *Digestão ácida*

A digestão ácida foi realizada num microondas MDS 200 Microwave Digestion System. Em cada ciclo foram digeridas nove amostras que incluíam um branco (apenas com HNO_3 concentrado) e uma amostra padrão de material vegetal (NCS Certified Reference Material NCS DC 73348 Bush branches and leaves, China National Analysis Center for Iron e Steel, 2008). Cada cilindro continha cerca de 0,3 g de amostra (partes aéreas ou raízes) e 5 mL de HNO_3 . O branco contém apenas 5 mL de HNO_3 e o padrão cerca de 0,29 g de material vegetal certificado (NCS) com 5 mL de HNO_3 . O cilindro que possuir maior massa será o que leva o sensor de temperatura e de pressão.

Cada ciclo tem três fases: 1ª fase, dura seis minutos com pressão máxima de 45 PSI; 2ª fase, dura também seis minutos com pressão máxima de 90 PSI e a 3ª fase, dura 10 minutos com pressão máxima de 150 PSI. O microondas só pode ser aberto quando a pressão no interior for inferior a 15 PSI. As amostras foram colocadas em balões volumétricos de 25 mL perfazendo o volume com água destilada. Este método não foi ajustado à amostra.

3.3.5.5.2 Quantificação multielementar

A quantificação multielementar foi realizada no Laboratório Central do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Foram quantificados os seguintes elementos: Al, As, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb e Zn.

3.3.6 Análise de dados

A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SPSS v18.0 para *software* de Windows. A análise de diferenças significativas entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de uma One-Way ANOVA (teste *post hoc* Tukey). Por outro lado, a comparação dos resultados das características de solos obtidos na 1ª amostragem e na 2ª Amostragem foi realizada segundo o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Para fins estatísticos, os resultados abaixo do limite de detecção foram assumidos como metade do limite de detecção. As correlações bivariadas de Pearson foram usadas para correlacionar as características das plantas e o solo, considerando um $r \geq 0,85$. O controlo de qualidade da análise foi feito através da realização de replicados, utilização de padrões de laboratório e brancos, e material vegetal de referência (NCS DC 73348 Bush branches and leaves). O número de replicados está indicado na respectiva Figura/Quadro, juntamente com os valores das médias e desvios padrões (DP). O controlo de qualidade das análises das concentrações totais dos elementos químicos do solo, foi garantida pelos processos internos do laboratório internacional certificado (Activation Laboratories).

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos resíduos e do solo

Para melhor compreensão da concentração dos elementos químicos nos resíduos aplicados, orgânicos e inorgânicos, e no solo foi realizada a sua caracterização química. Esta caracterização é de elevada importância uma vez que, a existência de variações nas propriedades dos solos podem influenciar as taxas de transferência dos elementos químicos para as plantas (Ross e Kaye, 1994).

Deste modo, determinaram-se algumas características químicas do solo desenvolvido sobre materiais de escombreira de *gossan*, dos correctivos (cinza de biomassa e mistura de resíduos orgânicos) aplicados a estes materiais, as quais estão representadas no Quadro 4.1.

4.1.1 Caracterização

Ao nível do pH pode-se constatar que a cinza possui um valor mais elevado, o que era expectável pois é um correctivo alcalinizante (Varennnes, 2003). O solo inicial apresenta elevada acidez ($3,51 \pm 0,06$) derivado dos materiais que lhe deram origem. Quanto à condutividade eléctrica, o solo inicial é classificado como não salino ($< 400 \mu\text{S}/\text{cm}$; INIA – LQARS, 2000).

O teor de carbono orgânico, considerando uma textura média ou fina, da mistura de resíduos atinge valores muito altos ($> 60 \text{ g}/\text{kg}$ solo; INIA-LQARS, 2000) e o solo inicial, possui um teor de carbono orgânico considerado muito baixo ($\leq 10 \text{ g}/\text{kg}$ solo; INIA-LQARS, 2000). Na concentração de azoto total, a mistura de resíduos possui uma concentração elevada ($14,11 \text{ g}/\text{kg}$ de resíduo) e, o solo inicial e a cinza possuem valores muito baixos de azoto ($0,16 \text{ mg}/\text{kg}$ solo e $0,25 \text{ mg}/\text{kg}$ cinza).

A razão C:N é inferior a 20 na mistura de resíduos (14,77), o que significa que os resíduos possuem mais azoto que o necessário aos microrganismos, ocorrendo a libertação de azoto em formas minerais mais rapidamente, aumentando deste modo, a disponibilidade de azoto mineral para as plantas (Ribeiro, 2011; Varennnes, 2003). Por outro lado, se a razão C:N se encontrar entre 20 e 30, que é o caso do solo inicial (27,31), os microrganismos necessitam de procurar no solo o azoto mineral necessário para completar as suas necessidades fisiológicas, resultando uma imobilização líquida do azoto nos microrganismos, ou seja, os microrganismos assimilam formas minerais de nutrientes, convertendo-os em formas orgânicas ou vão constituir a biomassa microbiana, diminuindo a disponibilidade de azoto mineral para as plantas (Ribeiro, 2011; Varennnes, 2003).

A divisão dos solos em classes de fertilidade, usada em Portugal para a classificação dos níveis de fósforo e potássio extraível, tem uma utilização limitada pois é aplicada a mesma classe para diferentes tipos de solo e culturas, podendo deste modo, não ser as mais apropriadas (Varennnes, 2003). No entanto, de acordo com as classes de fertilidade definidas em INIA – LQARS (2000), para o fósforo extraível e para o potássio extraível, o solo inicial possui uma fertilidade baixa (11-20 mg P/kg; Varennnes, 2003) e a mistura de resíduos possui uma fertilidade muito alta (> 170 mg P/kg; Varennnes, 2003). Para o teor de potássio extraível, tanto o solo inicial como a mistura de resíduos possuem uma fertilidade muito alta (> 170 mg K/kg; Varennnes, 2003).

Quadro 4.1 - Valores (Média \pm DP, n=3, excepto cinza n=1) do pH, condutividade eléctrica, C total, C orgânico, P extraível, K extraível e N total do solo inicial desenvolvido sobre a escombreira de *gossan*, da cinza e dos restantes resíduos usados.

	Solo inicial	Cinza	Restantes resíduos
pH	3,51 \pm 0,06	12,72	6,75 \pm 0,49
CE (μ S/cm)	302,93 \pm 119,64	ND	2,03 \pm 1,70
C total (g/kg)	ND	39,32	ND
Corg (g/kg)	4,37 \pm 0,66	ND	208,45 \pm 192,42
N total (mg/kg)	0,16 \pm 0,01	0,25	14110,00 \pm 3543,28
C:N	27,31	ND	14,77
P ext (mg/kg)	17,42 \pm 0,04	ND	2881,76 \pm 3631,60
K ext (mg/kg)	458,59 \pm 210,39	ND	4145,85 \pm 4403,03

ND – não determinado

4.1.2 Análise química multielementar

Determinaram-se os teores totais dos seguintes elementos: Al, As, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, Na, Pb, V e Zn. As concentrações dos elementos anteriormente mencionados encontram-se no Quadro 4.2.

Neste estudo, foram considerados os Valores Máximos Admissíveis (VAM) das concentrações dos elementos químicos para uso industrial do solo, de acordo com as Normas Canadianas da Qualidade do Solo para a Protecção da Saúde do Ambiente e Humana (CCME, 2007).

Quadro 4.2 - Concentrações totais dos elementos químicos dos resíduos (Média, n=1) e do solo inicial (Média ± DP, n=3) (mg/kg)

	Resíduos				Solo de Escombreira	VMA* (mg/kg)
	Cinza de biomassa	Bagaço de alfarroba	Lã de rocha	Substrato de morangueiro		
Al	30900	9540,00	53400,00	14400,00	20866,67 ± 850,49	-
As	30	14,00	0,025	8,00	9993,33 ± 1190,01	12,00
Ca	159000	183000,00	139000,00	80000,00	200,00 ± 0,00	-
Cu	215	156,00	80,00	158,00	311,33 ± 33,31	91,00
Fe	19800	16600,00	39900,00	10500,00	236333,33 ± 23459,18	-
K	25400	16000,00	6800,00	5300,00	3266,67 ± 57,74	-
Mg	14700	16000,00	42100,00	8400,00	300,00 ± 0,00	-
Mn	2880	716,00	1850,00	879,00	50,33 ± 7,02	-
Mo	4	7,00	10,00	33,60	11,00 ± 1,00	-
Na	5500	6200,00	13100,00	1100,00	766,67 ± 57,74	-
Ni	111	32,00	46,00	21,00	16,00 ± 2,00	50,00
Pb	95	14,80	1,50	17,90	33366,67 ± 1550,27	600,00
V	83	23,00	131,00	32,00	65,33 ± 2,08	130,00
Zn	253	308,00	201,00	268,00	111,33 ± 9,87	360,00

* VMA: valores máximos admissíveis para solos com uso industrial de acordo com as Normas Canadianas da Qualidade do Solo para a Protecção da Saúde do Ambiente e Humana (CCME, 2007)

No solo inicial as concentrações de As, Cu e Pb excedem o VMA (CCME, 2007). Embora os VMA sejam relativos aos solos, consideraram-se também para comparação com as concentrações dos elementos nos resíduos. Assim, as concentrações dos elementos químicos potencialmente contaminantes nos diferentes componentes que constituem a mistura de resíduos são, no geral, baixas, com excepção da concentração de As e Cu no resíduo de destilação da alfarroba (14 e 156 mg/kg, respectivamente), de Cu no substrato de morangueiro (158 mg/kg) e de As (30 mg/kg), Cu (215 mg/kg) e Ni (111 mg/kg) na cinza de biomassa.

4.2 Caracterização das amostras provenientes dos ensaios experimentais

4.2.1 Caracterização química

Foram determinadas algumas características dos solos após um mês de incubação (1ª amostragem) e no final do ensaio (2ª Amostragem) nos quatro tratamentos aplicados: Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O., as quais se apresentam no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 - Valores (Média \pm DP) do pH, condutividade eléctrica (CE), C orgânico, P extraível, K extraível e N total da 1ª amostragem (após um mês de incubação) (n=4) e da 2ª Amostragem (n=4) nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza + M.O.)

	Tratamentos			
	Controlo	Cinza	M.O.	Cinza+M.O.
1ª Amostragem				
pH	3,75 \pm 0,03 ^{aA}	5,90 \pm 0,10 ^{bA}	5,96 \pm 0,10 ^{bA}	6,83 \pm 0,17 ^{cA}
CE (μ S/cm)	137,25 \pm 20,47 ^{aA}	239,25 \pm 12,42 ^{abA}	619,75 \pm 292,62 ^{cA}	529 \pm 34,21 ^{bcA}
Corg (g/kg)	2,15 \pm 0,22 ^{aA}	2,55 \pm 0,47 ^{aA}	9,00 \pm 1,74 ^{cA}	5,78 \pm 0,39 ^{bA}
N total (mg/kg)	125,77 \pm 12,43 ^{aA}	145,05 \pm 132,24 ^{aA}	430,58 \pm 31,48 ^{bA}	318,58 \pm 24,82 ^{bA}
C:N	3,49	17,58	20,93	18,14
P ext (mg/kg)	0,44 \pm 0,00 ^{aA}	99,36 \pm 188,74 ^{abA}	546,78 \pm 416,43 ^{bA}	298,20 \pm 195,37 ^{abA}
K ext (mg/kg)	16,88 \pm 0,48 ^{aA}	122,45 \pm 58,89 ^{aA}	308,61 \pm 86,87 ^{aA}	376,26 \pm 407,83 ^{aA}
2ª Amostragem				
pH	4,01 \pm 0,09 ^{aB}	5,59 \pm 0,14 ^{bB}	6,53 \pm 0,34 ^{cB}	6,89 \pm 0,38 ^{cA}
CE (μ S/cm)	114,68 \pm 30,67 ^{aA}	114,33 \pm 85,23 ^{aB}	180,70 \pm 113,41 ^{aB}	223,23 \pm 230,82 ^{aB}
Corg (g/kg)	2,88 \pm 0,92 ^{aA}	3,60 \pm 1,10 ^{aB}	10,60 \pm 1,61 ^{bA}	9,38 \pm 0,38 ^{bB}
N total (mg/kg)	193,73 \pm 38,24 ^{aB}	192,50 \pm 67,42 ^{aA}	658,34 \pm 86,91 ^{bB}	638,27 \pm 75,12 ^{bB}
C:N	14,86	5,45	16,1	14,69
P ext (mg/kg)	0,44 \pm 0,00 ^{aA}	1,05 \pm 0,49 ^{aB}	622,10 \pm 565,67 ^{aA}	929,65 \pm 996,80 ^{aA}
K ext (mg/kg)	14,53 \pm 2,49 ^{aB}	38,39 \pm 4,14 ^{aB}	101,69 \pm 12,69 ^{bB}	123,48 \pm 28,21 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada uma das amostragens; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro de cada tratamento relativamente às duas amostragens.

Na 1ª amostragem é possível constatar que a aplicação de correctivos aumentou o valor do pH. O tratamento controlo difere significativamente de todos os outros tratamentos sendo o valor do pH no tratamento cinza+M.O o mais elevado. Na 2ª Amostragem, a subida de pH continua a ser observada com a aplicação de tratamentos. O tratamento controlo também difere significativamente dos outros tratamentos, porém os tratamentos que possuem M.O. (M.O. e cinza+M.O) não diferem significativamente e apresentam o valor de pH mais elevado. Comparando os tratamentos aplicados em cada uma das amostragens é possível concluir que, no tratamento controlo, cinza e M.O. os valores de pH diferem significativamente nas duas amostragens. No tratamento de Cinza+M.O. os valores de pH não diferem significativamente nas duas amostragens.

Os valores da condutividade eléctrica medidos na 1ª amostragem indicam que para os tratamentos controlo e cinza os solos não são considerados salinos ($< 400 \mu\text{S}/\text{cm}$; INIA-LQARS, 2000) e os solos dos tratamentos que possuem M.O. são considerados muito pouco salinos ($400\text{-}800 \mu\text{S}/\text{cm}$; INIA-LQARS, 2000). Na 2ª Amostragem, de acordo com os valores da condutividade eléctrica, e para todos os tratamentos, os solos não são considerados salinos ($< 400 \mu\text{S}/\text{cm}$; INIA-LQARS, 2000). Comparando os tratamentos aplicados em cada uma das amostragens é possível concluir que o tratamento controlo não difere significativamente nas duas amostragens. No entanto, os tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O. diferem nas duas amostragens.

Na 2ª Amostragem os valores de C orgânico indicam que houve um aumento em todos os tratamentos, excepto no tratamento controlo. Ainda assim, considerando uma textura média ou fina, todos os tratamentos nas duas amostragens possuem um teor de carbono orgânico muito baixo ($\leq 10 \text{ g/kg solo}$; INIA-LQARS, 2000). Quando comparados os tratamentos aplicados em cada uma das amostragens entre si, é possível concluir que o valor de carbono orgânico no tratamento controlo não difere nas duas amostragens. Porém, nos restantes tratamentos onde foram adicionados os correctivos há diferenças entre as duas amostragens, aumentando no final do ensaio.

Para o N total, à semelhança do C orgânico, verificou-se um aumento em todos os tratamentos no final do ensaio. Comparando os tratamentos aplicados em cada uma das amostragens, é possível concluir que os valores de N total dos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O. diferem entre si, enquanto que o tratamento com cinza não difere nas duas amostragens.

Na 1ª amostragem (após um mês de incubação e antes da sementeira do *C. salviifolius*), a razão C:N calculada está entre 3,49 e 20,93, sendo o valor mais baixo o do tratamento controlo e o mais elevado do tratamento só com M.O.. Na 2ª Amostragem, a razão C:N tem valores entre 5,45 e 16,10, sendo o valor mais baixo pertencente ao tratamento só com cinza e o mais elevado ao tratamento só com M.O..

Segundo Varennes (2003), se um resíduo adicionado apresentar uma razão C:N inferior a 20, que é o caso da mistura de resíduo (14,77), contém mais azoto do que o necessário para os microrganismos. Neste caso, a libertação de azoto em formas minerais ocorre mais rapidamente, aumentando a quantidade de azoto mineral disponível para as plantas. Este facto é facilmente verificado através dos resultados obtidos, os quais demonstram que em ambas as amostragens, os valores mais elevados da razão C:N são nos tratamentos que possuem só M.O.. No entanto, os valores da 2ª Amostragem tendem a ser um pouco mais baixos que os da 1ª amostragem uma vez que diferem um ano uma da outra e possivelmente o azoto disponível na 1ª amostragem poderá ter sido absorvido pelas plantas ao longo desse ano.

De um modo geral, os tratamentos controlo e cinza mostraram uma diminuição da concentração de P e de K extraíveis ao longo do tempo. Quanto ao P extraível, verifica-se que no tratamento M.O. e cinza+M.O. há um aumento ao longo do tempo, e para o K extraível verifica-se uma diminuição em todos os tratamentos.

Tendo em conta a concentração de P extraível pode concluir-se que na 1ª amostragem apenas o tratamento controlo possuía uma fertilidade considerada muito baixa (≤ 10 mg P/kg; INIA-LQARS 2000), a qual contrasta com os restantes tratamentos (cinza, M.O. e cinza+M.O.) os quais possuíam uma fertilidade considerada muito alta (> 90 mg P/kg; INIA-LQARS, 2000). Na 2ª Amostragem, verificaram-se as mesmas classes de fertilidade anteriormente referidas nos respectivos tratamentos, à excepção do tratamento só com cinza, que passou de uma fertilidade muito alta (> 90 mg P/kg; INIA-LQARS, 2000) para muito baixa (≤ 10 mg P/kg; INIA-LQARS, 2000).

Quanto à concentração de K extraível, na 1ª amostragem a fertilidade é muito baixa (≤ 20 mg K/kg; INIA-LQARS, 2000) no tratamento controlo, alta (86-170 mg K/kg; INIA-LQARS, 2000) no tratamento só com cinza e muito alta (> 170 mg K/kg; INIA-LQARS, 2000) nos tratamentos com M.O.. Na 2ª Amostragem, o tratamento controlo possui a mesma classe de fertilidade da 1ª amostragem, enquanto que nos restantes tratamentos se verificou uma diminuição na classe de fertilidade: tratamento só com cinza – fertilidade baixa (21-40 mg K/kg; INIA-LQARS, 2000), tratamentos com M.O. – fertilidade alta (86-170 mg K/kg; INIA-LQARS, 2000).

Através dos resultados obtidos, pode afirmar-se que, de forma geral, a aplicação de correctivos melhora as características do solo, principalmente com matéria orgânica.

4.2.2 Fracção extraível dos elementos químicos

De modo a estudar a disponibilidade dos elementos químicos no solo determinaram-se as fracções extraíveis com solução Rhizzo nas amostras colhidas após um mês de incubação (1ª Amostragem) e no final do ensaio (2ª Amostragem). Os elementos químicos analisados constam do Quadro 4.4.

Quadro 4.4 - Concentração (Média \pm DP, n=4) dos elementos químicos extraíveis com solução Rhizzo nas amostras de solo colhidas após um mês de incubação (1ª amostragem) e no final do ensaio nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) (mg/kg).

	Controlo	Cinza	M.O.	Cinza+M.O.
<u>1ª Amostragem</u>				
Al	9,46 \pm 2,23 ^{aA}	48,76 \pm 20,10 ^{bA}	47,51 \pm 18,04 ^{bA}	79,45 \pm 15,86 ^{cA}
As	0,13 \pm 0,01 ^{aA}	2,88 \pm 0,48 ^{bA}	2,82 \pm 0,46 ^{bA}	2,69 \pm 1,07 ^{bA}
Ca	11,28 \pm 4,59 ^{aA}	92,13 \pm 17,87 ^{aA}	540,70 \pm 88,96 ^{bA}	597,23 \pm 105,81 ^{cA}
Cu	0,83 \pm 0,24 ^{bA}	0,54 \pm 0,01 ^{aA}	< 0,58 ^{aA}	< 0,58 ^{abA}
Fe	13,47 \pm 1,56 ^{aA}	50,58 \pm 26,37 ^{bA}	49,35 \pm 25,57 ^{abA}	65,06 \pm 9,00 ^{bA}
K	4,11 \pm 1,63 ^{aA}	95,10 \pm 35,68 ^{bA}	92,70 \pm 33,69 ^{bA}	67,75 \pm 9,96 ^{bA}
Mg	1,99 \pm 1,30 ^{aA}	3,30 \pm 1,45 ^{aA}	64,30 \pm 27,93 ^{bA}	75,18 \pm 10,65 ^{bA}
Mn	0,53 \pm 0,01 ^{aA}	8,42 \pm 2,13 ^{bA}	8,23 \pm 2,02 ^{bA}	8,42 \pm 5,18 ^{bA}
Mo	< 0,054 ^{aA}	< 0,054 ^{aA}	< 0,054 ^{aA}	0,066 \pm 0,024 ^{bA}
Na	2,61 \pm 1,02 ^{aA}	42,81 \pm 16,39 ^{bA}	41,72 \pm 15,54 ^{bA}	66,39 \pm 7,68 ^{cA}
Ni	< 0,53 ^{aA}	0,83 \pm 0,34 ^{aA}	0,81 \pm 0,33 ^{aA}	1,96 \pm 2,82 ^{aA}
Pb	7,80 \pm 4,74 ^{bA}	2,68 \pm 0,03 ^{aA}	< 0,04 ^{aA}	< 0,04 ^{aA}
V	< 5,51 ^{aA}	< 5,51 ^{bA}	< 5,51 ^{aA}	< 5,51 ^{cA}
Zn	< 0,53 ^{aA}	2,63 \pm 1,61 ^{bA}	2,59 \pm 1,61 ^{abA}	1,10 \pm 0,31 ^{abA}
<u>2ª Amostragem</u>				
Al	10,68 \pm 2,93 ^{aA}	12,52 \pm 4,66 ^{abB}	96,72 \pm 46,16 ^{bA}	107,23 \pm 60,54 ^{bA}
As	0,17 \pm 0,02 ^{abB}	0,22 \pm 0,10 ^{abB}	0,81 \pm 0,20 ^{bB}	0,85 \pm 0,07 ^B
Ca	9,37 \pm 3,11 ^{aA}	65,86 \pm 22,71 ^{aA}	628,28 \pm 190,42 ^{bA}	632,48 \pm 158,45 ^{bA}
Cu	0,98 \pm 0,14 ^{cbB}	0,76 \pm 0,10 ^{bbB}	< 0,54 ^{abB}	< 0,54 ^{abB}
Fe	12,99 \pm 4,50 ^{aA}	11,70 \pm 3,60 ^{abB}	81,75 \pm 28,64 ^{bA}	74,15 \pm 29,45 ^{bA}
K	5,91 \pm 1,04 ^{abB}	14,71 \pm 2,32 ^{abB}	53,61 \pm 4,52 ^{bA}	55,53 \pm 12,56 ^{bA}
Mg	1,11 \pm 0,42 ^{aA}	5,32 \pm 1,69 ^{bA}	4,49 \pm 1,79 ^{abB}	4,38 \pm 2,45 ^{abB}
Mn	< 0,53 ^{aA}	1,75 \pm 0,26 ^{abB}	12,50 \pm 2,78 ^{bB}	10,68 \pm 0,43 ^{bA}
Mo	< 0,03 ^{abB}	< 0,03 ^{aA}	< 0,03 ^{aA}	< 0,03 ^{abB}
Na	18,64 \pm 3,42 ^{abB}	20,26 \pm 3,41 ^{aA}	89,80 \pm 11,36 ^{bB}	81,25 \pm 25,31 ^{bA}
Ni	< 0,54 ^{abB}	< 0,54 ^{abB}	< 0,54 ^{aA}	< 0,54 ^{abB}
Pb	38,22 \pm 17,49 ^{bbB}	6,20 \pm 3,08 ^{abB}	< 2,72 ^{abB}	< 2,72 ^{abB}
V	< 5,44 ^{abB}	< 5,44 ^{abB}	< 5,44 ^{abB}	< 5,44 ^{abB}
Zn	1,07 \pm 0,41 ^{abB}	0,76 \pm 0,21 ^{abB}	4,76 \pm 2,72 ^{bA}	1,44 \pm 0,40 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada uma das amostragens; letras maiúsculas indicam diferenças significativas dentro de cada tratamento relativamente às duas amostragens.

Embora os elementos químicos, em particular os potencialmente tóxicos, no solo inicial desenvolvido sobre a escombreira de *gossan* apresentassem concentrações totais muito elevadas, as concentrações da fracção disponível eram bastante baixas, não excedendo 8,7 % do valor total na 1ª amostragem, com excepção do Mn cuja concentração da fracção disponível está entre 16,36 e 16,74 % nos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O.. A concentração de As encontra-se entre 0,0013 e 0,0282 %, a de Cu entre 0,1683 e 0,2655 %, a de Mo entre 0,4841 e 0,6025 %, a de Pb entre 0,0080 e 0,0234 %, a de V entre 8,0194 e 8,4412 % e a de Zn entre 0,4783 e 2,3661 % do total. Na 2ª Amostragem, as

concentrações da fracção disponível não excedem 8,4 % do valor total, com excepção do Mn nos tratamentos com M.O. (21,21 e 24,84 %). A concentração de As encontra-se entre 0,0017 e 0,0085 %, o Cu entre 0,1719 e 0,3150 %, a de Mo entre 0,1944 e 0,2667 %, a de Pb entre 0,0080 e 0,1145 %, a de V entre 8,0199 e 8,3304 % e a de Zn entre 0,6820 e 4,2731 % do total.

4.2.2.1 Macronutrientes

Nas duas amostragens as concentrações de Ca dos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O. foram sempre superiores à concentração do tratamento controlo. Os valores de Ca e os de C orgânico estão correlacionados negativamente ($r = -0,984$) no tratamento M.O. na 2ª Amostragem. Comparando os valores de concentração de K entre as amostragens, verifica-se que apenas o tratamento controlo e o tratamento cinza diferem significativamente. Contudo, os tratamentos que possuem M.O. diferem significativamente com o tratamento controlo e cinza em cada uma das amostras. Na 1ª amostragem verificou-se uma correlação entre os valores de pH e os de K no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,929$). Também foi correlacionado com o C orgânico e obtiveram-se as seguintes correlações na 1ª amostragem: no tratamento M.O. ($r = -0,885$) e no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,899$). Para as concentrações de Mg verificou-se que relativamente à 1ª amostragem, a 2ª Amostragem não difere significativamente no tratamento controlo e no tratamento cinza, diferindo nos tratamentos que possuem M.O.. Os valores da concentração de Mg dos tratamentos com correctivos são superiores aos valores do tratamento controlo. Foi correlacionado com o carbono orgânico e verificou-se uma correlação negativa na 1ª amostragem no tratamento cinza+M.O. ($r = -0,865$).

4.2.2.2 Micronutrientes

Ao longo do tempo, os valores de Cu aumentaram no tratamento controlo e no tratamento cinza. A concentração de Cu no tratamento M.O. está correlacionada na 1ª amostragem, com o carbono orgânico ($r = 0,977$). Relativamente às concentrações de Fe, estas aumentam nos tratamentos M.O. e cinza+M.O. e diminuem nos tratamentos controlo e cinza. Como seria de esperar, em função do comportamento geoquímico do Fe, as concentrações deste elemento estão correlacionadas negativamente com o pH do solo nos vários tratamentos ($r = -0,928$), ou seja, aumentando o valor do pH diminui a disponibilidade do Fe. Relativamente aos valores de Fe e de C orgânico na 1ª amostragem no tratamento cinza+M.O., obteve-se uma correlação ($r = -0,917$). A concentração de Mo diminui ao longo do tempo em todos os tratamentos. Obtiveram-se correlações entre os valores de pH e os de Mo na 1ª Amostragem: no tratamento cinza ($r = 0,922$) e no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,858$) e na 2ª Amostragem: no tratamento M.O. ($r = 0,910$). A concentração de Ni diminui

em todos os tratamentos ao longo do tempo, não diferindo significativamente entre os tratamentos aplicados. Ao longo do tempo, verificou-se um aumento dos valores de Zn nos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O. e uma diminuição no tratamento cinza. Na 2ª Amostragem, obtiveram-se correlações entre os valores de Zn e os de pH do solo no tratamento M.O. ($r = 0,962$) e no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,923$).

4.2.2.3 Outros elementos

Ao longo do tempo, a concentração de Al aumenta nos tratamentos que possuem M.O. e diminui no tratamento com cinza. Na 2ª Amostragem obteve-se uma correlação negativa entre os valores de pH e os de Al no tratamento cinza+M.O. ($r = -0,925$), o qual apresenta o valor de pH do solo mais alto (Quadro 4.3), estando de acordo com o comportamento geoquímico do Al. O aumento do valor de pH do solo diminui a disponibilidade de Al. Também se obteve uma correlação negativa entre os valores de C orgânico e os valores de Al, na 1ª amostragem no tratamento M.O. ($r = -0,856$) e no tratamento cinza+M.O. ($r = -0,911$). Relativamente ao As, a concentração da fracção disponível deste elemento aumenta com a aplicação de correctivos. Porém, na 2ª Amostragem, a concentração do As diminui nos tratamentos com correctivos e aumenta no tratamento controlo, onde as plantas tiveram um desenvolvimento muito fraco (ponto 4.3.2) (Quadro 4.4). Observou-se uma correlação positiva no tratamento cinza+M.O. entre o pH e o As ($r = 0,921$) na 1ª amostragem. Neste mesmo tratamento a concentração de As também está correlacionada com o C orgânico ($r = 0,861$), na 1ª amostragem. A concentração de Pb e de V aumentaram ao longo do tempo em todos os tratamentos, à excepção da concentração de Pb no tratamento cinza+M.O.. Tanto na 1ª amostragem como na 2ª Amostragem, a concentração de Pb no tratamento controlo é mais elevada que nos restantes tratamentos com correctivos. As concentrações de Pb e de V estão correlacionadas, na 1ª amostragem, com o C orgânico: no tratamento M.O., ($r = 0,983$) e ($r = 0,983$) para o Pb e para o V, respectivamente. Ao longo do tempo, os valores de Mn aumentaram nos tratamentos M.O. e cinza+M.O. e diminuíram no tratamento cinza. Obtiveram-se correlações entre os valores de Mn e os de pH do solo no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,868$) na 1ª amostragem, e no tratamento M.O. ($r = 0,903$) na 2ª Amostragem. Foram também obtidas correlações entre os valores de Mn e os de C orgânico na 1ª amostragem no tratamento cinza+M.O. ($r = 0,875$) e na 2ª Amostragem no tratamento cinza. ($r = -0,952$).

De forma geral, a aplicação de correctivos melhora as características do solo, principalmente nos tratamentos com matéria orgânica.

4.3 Caracterização do material vegetal

4.3.1 Percentagem de germinação

Como foi anteriormente mencionado no capítulo 3, foram realizadas duas sementeiras. Semearam-se um total de 332 sementes, aproximadamente 151 sementes (0,25 g) na primeira sementeira e 181 sementes (0,30 g) na segunda sementeira. Os dados relativos à percentagem de germinação encontram-se na Figura 4.1. O tratamento que demonstrou maior sucesso na germinação das sementes de *C. salviifolius*, foi o tratamento com M.O., com um desenvolvimento entre 5 e 14 plântulas, equivalente a $2,94 \pm 1,14$ % de germinação. No tratamento controlo não se observou germinação.

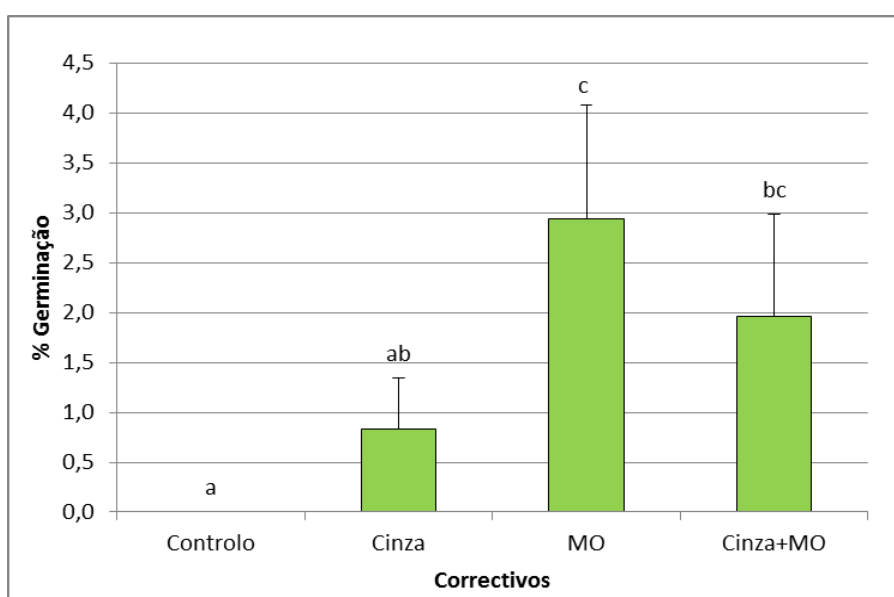


Figura 4.1 - Percentagem de germinação (Média \pm DP, n=4) do *Cistus salviifolius* nos diferentes tipos de tratamento (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) após a 2ª sementeira em 2011. Nota: letras diferentes indicam diferenças significativas

4.3.2 Massa fresca total da parte aérea e das raízes no fim do ensaio

A massa fresca da parte aérea e as raízes das plantas dos tratamentos controlo e cinza diferem significativamente dos tratamentos com M.O. e cinza+M.O.. Através da Figura 4.2, verifica-se que os tratamentos que possuem M.O. promovem o desenvolvimento da parte aérea e radicular tal como é referido por Varennes (2003).

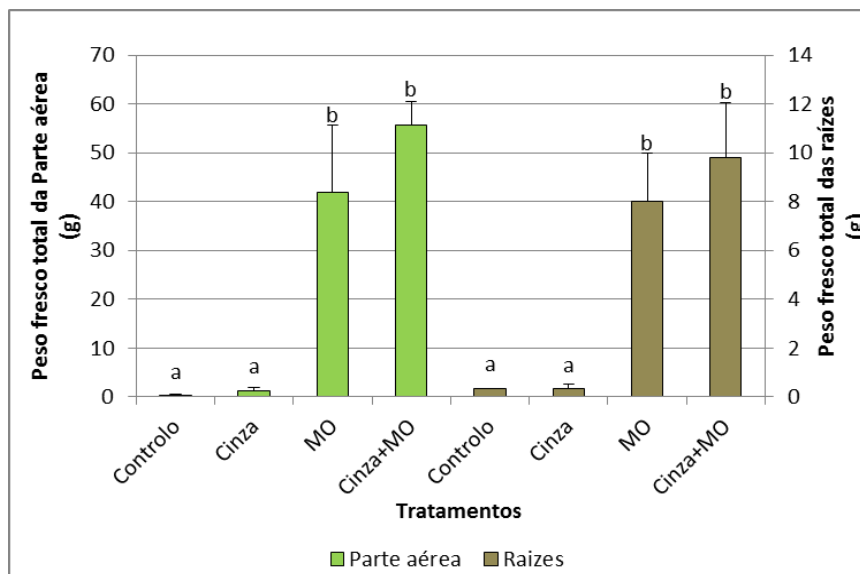


Figura 4.2 - Massa fresca total (Média \pm DP, n=4) da parte aérea e das raízes do *Cistus salviifolius* nos diferentes tratamentos no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Quanto à razão PA/R, foram obtidos os seguintes resultados: tratamento controlo (0,48), tratamento cinza (3,97), tratamento M.O. (5,24) e tratamento cinza+M.O. (5,69). Deste modo, nos tratamentos onde foram aplicados correctivos verifica-se que há maior desenvolvimento da parte aérea do que das raízes.

4.3.3 Percentagem de água nas plantas no fim do ensaio

Nos resultados obtidos é possível observar que os tratamentos que possuem correctivos aumentam bastante a percentagem de água nas folhas (Figura 4.3). Assim, o tratamento controlo difere significativamente dos restantes tratamentos.

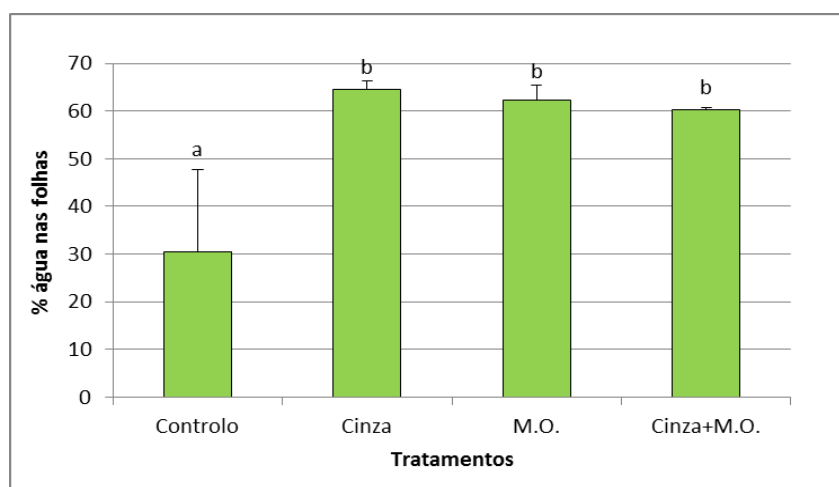


Figura 4.3 - Percentagem (Média \pm DP, n=4) água nas plantas de *C. salviifolius*) no fim do ensaio, nos diversos tratamentos aplicados. Letras diferentes indicam diferenças significativas

4.3.4 Quantificação de elementos químicos nas folhas e nas raízes

Os elementos químicos analisados nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* apresentam-se no Quadro 4.5.

Quadro 4.5 - Valores (Média \pm DP) da concentração dos elementos químicos nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* nos diferentes tratamentos (Controlo, Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) expressos em mg/kg massa seca, no final do ensaio (n = 4, excepto tratamento controlo e tratamento cinza n=1, para o branco e para o padrão n=3)

	Controlo	Cinza	MO	Cinza+MO	Branco ($\mu\text{g/L}$)	Padrão NCS DC 73348	LCT* (mg/kg)
<u>Parte Aérea</u>							
Al	1147,13 ^c	82,47 ^b	56,30 \pm 31,29 ^{ab}	41,94 \pm 14,45 ^a	143,10 \pm 90,83	849,39 \pm 99,44	-
As	666,50 ^c	4,51 ^b	2,90 \pm 1,14 ^a	3,18 \pm 1,00 ^{ab}	5,00 \pm 0,00	0,43 \pm 0,03	5-20
B	74,33 ^c	40,86 ^b	25,99 \pm 6,10 ^a	22,16 \pm 5,34 ^a	25,00 \pm 0,00	40,73 \pm 0,56	50-200
Ca	5030,79 ^b	10577,85 ^c	4277,73 \pm 723,76 ^{ab}	3957,78 \pm 641,28 ^a	1350,85 \pm 412,52	20480,97 \pm 178,26	-
Cu	108,85 ^c	10,86 ^b	2,54 \pm 1,38 ^a	2,06 \pm 1,07 ^a	5,00 \pm 0,00	4,80 \pm 0,05	20-100
Fe	11917,22 ^c	147,61 ^b	73,96 \pm 33,69 ^a	69,94 \pm 20,37 ^a	73,68 \pm 11,81	970,04 \pm 19,09	-
K	3063,31 ^a	4203,43 ^b	4520,42 \pm 374,03 ^b	4115,28 \pm 556,32 ^b	50,00 \pm 0,00	8719,50 \pm 40,79	-
Mg	1128,38 ^a	1525,35 ^b	1180,59 \pm 146,86 ^a	1161,64 \pm 212,55 ^a	58,90 \pm 9,44	3498,10 \pm 15,21	-
Mn	50,57	544,41 ^b	81,06 \pm 76,31 ^a	28,65 \pm 3,69 ^a	1,25 \pm 0,00	60,09 \pm 2,44	400-1000
Mo	3,97 ^c	0,89 ^a	1,98 \pm 0,41 ^b	1,26 \pm 0,49 ^a	5,00 \pm 0,00	0,43 \pm 0,03	10-50
Na	10447,65 ^c	1055,01 ^b	687,08 \pm 134,26 ^a	777,60 \pm 225,78 ^a	224,82 \pm 54,55	14519,06 \pm 120,48	-
P	1112,11 ^{ab}	863,57 ^a	2176,65 \pm 346,64 ^c	1482,54 \pm 293,16 ^b	227,25 \pm 42,43	871,51 \pm 20,30	-
Pb	2818,22 ^c	11,57 ^b	3,96 \pm 2,89 ^a	7,34 \pm 2,71 ^a	5,39 \pm 3,23	7,49 \pm 0,28	30-300
Zn	338,15 ^c	107,62	91,76 \pm 46,06 ^{ab}	43,80 \pm 19,14 ^a	25,56 \pm 3,16	20,43 \pm 0,08	100-400
<u>Raízes</u>							
Al	3605,52 ^b	-	435,20 \pm 168,95 ^a	266,77 \pm 81,39 ^a	143,10 \pm 90,83	849,39 \pm 99,44	-
As	356,87 ^b	-	122,85 \pm 72,75 ^a	64,94 \pm 18,05 ^a	5,00 \pm 0,00	0,43 \pm 0,03	-
B	625,00 ^b	-	11,77 \pm 2,24 ^a	9,62 \pm 0,93 ^a	25,00 \pm 0,00	40,73 \pm 0,56	-
Ca	30536,42 ^c	-	3295,95 \pm 298,71 ^b	2648,01 \pm 142,86 ^a	1350,85 \pm 412,52	20480,97 \pm 178,26	-
Cu	125,00 ^b	-	14,79 \pm 6,35 ^a	10,17 \pm 2,67 ^a	5,00 \pm 0,00	4,80 \pm 0,05	-
Fe	8959,10 ^b	-	2870,30 \pm 1562,86 ^a	1470,07 \pm 539,55 ^a	73,68 \pm 11,81	970,04 \pm 19,09	-
K	1250,00 ^a	-	1519,31 \pm 261,92 ^a	1308,69 \pm 263,81 ^a	50,00 \pm 0,00	8719,50 \pm 40,79	-
Mg	2177,49 ^b	-	772,07 \pm 123,69 ^a	759,33 \pm 29,39 ^a	58,90 \pm 9,44	3498,10 \pm 15,21	-
Mn	104,89 ^a	-	206,25 \pm 121,18 ^a	116,06 \pm 18,40 ^a	1,25 \pm 0,00	60,09 \pm 2,44	-
Mo	125,00 ^b	-	2,41 \pm 0,62 ^a	1,77 \pm 0,90 ^a	5,00 \pm 0,00	0,43 \pm 0,03	-
Na	6531,57 ^b	-	435,43 \pm 125,06 ^a	379,89 \pm 138,45 ^a	224,82 \pm 54,55	14519,06 \pm 120,48	-
P	7296,46 ^b	-	518,98 \pm 58,65 ^a	517,84 \pm 159,59 ^a	227,25 \pm 42,43	871,51 \pm 20,30	-
Pb	1610,76 ^b	-	469,75 \pm 268,93 ^a	247,45 \pm 67,67 ^a	5,39 \pm 3,23	7,49 \pm 0,28	-
Zn	459,26 ^c	-	41,57 \pm 15,24 ^b	22,01 \pm 2,41 ^a	25,56 \pm 3,16	20,43 \pm 0,08	-

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos; No tratamento cinza das raízes de *Cistus salviifolius* não existem valores devido à escassa quantidade de amostra, como tal, não pode ser correlacionado com os restantes parâmetros. * LCT: limites considerados tóxicos de acordo com as Concentrações Aproximadas de Elementos vestigiais em Tecido de Folhas Maduras para Diversas Espécies (Kabata-Pendias e Pendias, 2001)

Na parte aérea, a concentração da maioria dos elementos dos tratamentos com correctivos (cinza, M.O. e cinza+M.O.) encontra-se abaixo dos valores padrão NCS DC 73348. Exceptuam-se o As, o Mo e o Zn, os quais possuem concentrações superiores ao padrão em todos os tratamentos. Nas raízes, as concentrações dos principais macro e micronutrientes encontram-se dentro dos valores padrão nos tratamentos que possuem

M.O., exceptuando o As, o Cu, o Pb e o Zn, os quais possuem concentrações superiores em todos os tratamentos.

4.3.4.1 Macronutrientes

As concentrações de Ca, K e Mg tendem a ser mais elevadas quando comparadas com as concentrações de P (Varenes, 2003). Varenes (2003) indica que as plantas demonstram possuir elevadas concentrações de macronutrientes, significando um fornecimento contínuo de nutrientes às raízes. O Ca e K apresentam concentrações elevadas em todos os tratamentos, tanto na parte aérea como nas raízes, sendo os da parte aérea os mais elevados. No Mg, as concentrações são igualmente elevadas, porém, no tratamento controlo a concentração nas raízes é mais elevada do que na parte aérea, demonstrando que sem a utilização de correctivos o Mg tem tendência a ser acumulado nas raízes. O fósforo é translocado em menor quantidade para a parte aérea no tratamento controlo do que nos outros tratamentos.

Quando comparado o tratamento controlo com os tratamentos com correctivos observa-se que, para a parte aérea, o tratamento controlo possui concentrações mais elevadas para o Ca e concentrações mais baixas para o K e para o Mg. Nas raízes, as concentrações de Ca e de K no tratamento controlo são aproximadas às concentrações obtidas nos tratamentos com correctivos. Porém, a concentração de Mg é bastante mais elevada no tratamento controlo do que nos restantes tratamentos.

4.3.4.2 Micronutrientes

A concentração de elementos químicos nas plantas depende da planta em causa e do tipo de solo (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Os níveis críticos de B nas plantas são de 5 – 30 mg/kg MS (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). O tratamento controlo da parte aérea excede muito o limite de 30 mg/kg MS. Quanto às raízes, o tratamento controlo possui concentrações de B muito mais elevadas do que os tratamentos com M.O.. É possível constatar que sem a aplicação de correctivos, o B tem tendência a acumular-se na parte aérea. Kabata-Pendias e Pendias (2001) refere vários autores que verificaram precisamente que, sem a aplicação de qualquer correctivo, o B se acumula nas raízes.

As concentrações de Cu na parte aérea do tratamento controlo ultrapassam o limite considerado tóxico (20 – 100 mg/kg, Adriano, 2001). Quanto aos restantes tratamentos, possuem concentrações consideradas normais por Adriano (2001). No entanto, os valores das concentrações das raízes são todos mais elevados do que os da parte aérea. Abreu *et al.* (2012a) obteve valores de concentração de Cu mais baixos na parte aérea e nas raízes de plantas da mesma espécie colhidas em áreas mineiras da Faixa Piritosa. Porém, em ambos os casos se verifica que pode ser devido à diminuta translocação do Cu das raízes

para a parte aérea, ou seja, este elemento acumula-se nas raízes. O Cu é maioritariamente absorvido em formas complexas pelas raízes. No entanto, é mais provável que seja absorvido em formas dissociadas (Cu^+ ou Cu^{2+}) (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Quando comparadas entre tratamentos, as concentrações de Cu do tratamento controlo são significativamente diferentes dos tratamentos com M.O., sendo a concentração do tratamento controlo mais elevada e as mais baixas dos tratamentos M.O. e cinza+M.O.. Nestes tratamentos, as concentrações de Cu estão na gama das concentrações consideradas deficientes para as plantas (2 - 5 mg/kg, Kabata-Pendias e Pendias, 2001).

Tanto na parte aérea como nas raízes, as concentrações de Fe são muito elevadas. A capacidade das raízes reduzirem Fe^{3+} para Fe^{2+} pode ser fundamental na absorção deste catião pelas plantas. O ferro não é imediatamente transportado para os tecidos das plantas, deste modo ocorre em concentrações mais baixas nas partes mais jovens das plantas (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Estes autores referem ainda que a absorção e transporte de Fe entre os diferentes órgãos da planta são afectados por diversos factores ambientais, tal como o pH do solo. Quando comparado o tratamento controlo com os restantes tratamentos, é possível observar a influência do pH na absorção de Fe. Nos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O., o Fe tem tendência a acumular-se nas raízes, ao contrário do tratamento controlo onde a concentração de Fe é mais elevada na parte aérea. No entanto, as plantas que cresceram no solo sem correctivos (controlo) têm as concentrações mais altas de Fe, reflectindo uma maior absorção deste elemento num solo em que o valor de pH é o mais baixo (pH= 3,8 no controlo e entre 5,9 e 6,8 nos tratamentos com correctivos). As concentrações da parte aérea dos tratamentos com M.O. encontram-se num limite considerado normal (50 – 100 mg /kg; Mengel e Kirkby, 2001). Contrariamente ao verificado no tratamento controlo, tanto para a parte aérea como para as raízes, Abreu *et al.* (2012a) obtiveram, para a mesma espécie colhida em ambiente mineiro, valores muito baixos de concentração de Fe. Os valores da concentração de Mn da parte aérea de *C. salviifolius* dos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O. encontram-se dentro dos valores considerados normais para diversas espécies de plantas (30 – 300 mg/kg, Kabata-Pendias e Pendias, 2001). O tratamento com cinza excede o limite anteriormente referido, podendo considerar-se fitotóxico. Nas raízes, os valores das concentrações de Mn nas plantas dos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O. encontram-se dentro dos limites considerados normais. No entanto, o tratamento cinza não foi avaliado por a massa de raiz não ser suficiente para análise. A absorção passiva de Mn poderá ocorrer, especialmente em concentrações altas e tóxicas deste metal em solução. Kabata-Pendias e Pendias (2001), referem que o Mn é rapidamente absorvido pelas plantas e translocado para a parte aérea e que deste modo, é provável que não se acumule nas raízes. Contudo, não é o que se verifica, pois a concentração de Mn é maior nas raízes do que na parte aérea. As concentrações de Mo

são ligeiramente mais elevadas nas raízes do que na parte aérea. Ainda assim, as concentrações de Mo na parte aérea encontram-se dentro do limite considerado normal por Kabata-Pendias e Pendias (2001; (0,2 – 5 mg/kg MS) (Quadro 4.5). Nas raízes, as concentrações de Mo no tratamento controlo são muito elevadas quando comparadas com as concentrações dos tratamentos M.O. e cinza+M.O.. No entanto, Kabata-Pendias e Pendias (2001) e Abreu *et al* (2012a) referem que ocorrem diversas interações complexas entre o Mo e outros elementos químicos, como por exemplo efeitos antagónicos, ou mesmo devido ao pH. Porém, as concentrações de Mo na parte aérea das plantas nos tratamentos cinza e cinza+M.O. diferem significativamente do tratamento controlo, enquanto que nas raízes as concentrações deste elemento nos tratamentos com M.O. não diferem entre eles, mas diferem quando comparados com as do tratamento controlo.

Kabata-Pendias e Pendias (2001) referem que o valor fitotóxico da concentração de Zn na parte aérea das plantas está entre 100 e 400 mg/kg. As concentrações de Zn nas plantas nos tratamentos controlo e cinza estão dentro desta gama (Quadro 4.5). Porém, nos tratamentos com M.O. as plantas apresentam na parte aérea valores considerados suficientes ou normais (27-150 mg/kg, Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Nas raízes, a concentração de Zn é mais baixa nos tratamentos com M.O. do que no tratamento controlo. O zinco é transportado maioritariamente para a parte aérea facto também constatado por Abreu *et al.* (2012a).

4.3.4.3 Outros elementos

De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), as concentrações de Al nas plantas variam dependendo das características do solo. As concentrações de Al na parte aérea das plantas nos tratamentos com correctivos apresentam concentrações muito mais baixas do que no tratamento controlo. Já nas raízes, observa-se o mesmo facto, porém, as concentrações nos tratamentos M.O. e cinza+M.O. são bastante mais elevadas que na parte aérea dos respectivos tratamentos. De acordo com Pellet *et al.* (1997), as raízes parecem ser mais tolerantes ao excesso de Al, pois excluem os compostos fosfatados. No entanto, as concentrações de Al são menores nos tratamentos com M.O. quando comparadas com o tratamento controlo.

Na natureza, o arsénio encontra-se na forma elementar ou sob forma de compostos, a qual é mais abundante. A forma de As mais comum em meios redutores é o As(III), sendo também a mais disponível para as plantas (Varennnes, 2003). Os valores das concentrações de As na parte aérea, dos tratamentos que possuem correctivos não alcançam os níveis tóxicos (5 – 20 mg/kg) referidos por Kabata-Pendias e Pendias (2001) para diversas espécies de plantas. Os correctivos melhoram as características do solo, diminuindo deste modo a capacidade de absorção do As por esta espécie. Contrariamente ao obtido por

Abreu *et al* (2012a), em plantas que crescem espontaneamente nas áreas mineiras da FPI, o tratamento controlo excede os níveis tóxicos de As na parte aérea (666,5 mg As/kg MS). Nas raízes, o tratamento controlo possui uma concentração muito elevada quando comparado com as concentrações dos tratamentos M.O. e cinza+M.O.. Os valores das concentrações de Pb da parte aérea dos tratamentos com correctivos não alcançam o limite considerado fitotóxico (30 – 300 mg/kg, Kabata-Pendias e Pendias, 2001). No entanto, a concentração de Pb na parte aérea das plantas do tratamento controlo ultrapassa o limite considerado tóxico (2818,2 mg/kg MS). Nas raízes, a concentração de Pb do tratamento controlo é mais elevada do que a concentração de Pb nos tratamentos M.O. e cinza+M.O.. Tal como observado para o As, os correctivos melhoram as características do solo diminuindo a absorção do Pb pelas plantas. Embora o chumbo não seja facilmente disponível no solo, é absorvido e armazenado nas paredes das células das raízes.

De uma maneira geral, as plantas dos tratamentos com correctivos possuem concentrações mais baixas de elementos químicos essenciais às plantas e fitotóxicos, tanto na parte aérea como nas raízes.

4.3.5 Coeficiente de translocação

O coeficiente de translocação (CT) avalia a capacidade que a planta tem de translocar elementos químicos das raízes para a parte aérea. Se os valores forem superiores a um, significa que são translocados da raiz para a parte aérea. Se forem inferiores a um, são em grande parte retidos nas raízes (Abreu *et al.*, 2012a; Abreu *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2012; Anjos *et al.*, 2012). Os valores obtidos para as plantas analisadas encontram-se no Quadro 4.6.

Quadro 4.6 - Coeficiente de translocação dos elementos químicos no *Cistus salviifolius* nos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O.

	Controlo 1	M.O.				Cinza+M.O.			
		9	10	11	12	13	14	15	16
Al	0,32	0,17	0,08	0,26	0,07	0,33	0,08	0,15	0,14
As	1,87	0,02	0,05	0,04	0,01	0,09	0,02	0,05	0,05
B	0,12	1,84	2,46	1,95	2,60	2,55	2,09	1,50	3,24
Ca	0,16	1,07	1,46	1,21	1,46	1,77	1,43	1,13	1,68
Cu	0,87	0,13	0,25	0,06	0,21	0,43	0,21	0,04	0,23
Fe	1,33	0,02	0,04	0,04	0,01	0,09	0,03	0,05	0,05
K	2,45	3,85	2,56	2,77	3,00	3,71	2,40	2,72	4,19
Mg	0,52	1,34	1,57	1,72	1,53	1,90	1,45	1,12	1,67
Mn	0,48	0,51	0,30	0,30	0,28	0,22	0,27	0,25	0,25
Mo	0,03	0,73	0,91	0,75	0,93	1,94	0,52	0,53	0,79
Na	1,60	1,80	1,17	2,16	1,46	2,20	1,38	1,17	5,64
P	0,15	3,71	4,33	4,30	4,39	3,89	2,04	2,21	4,18
Pb	1,75	0,01	0,02	0,01	0,00	0,05	0,01	0,03	0,03
Zn	0,74	1,73	2,41	1,76	2,71	2,79	1,64	1,29	2,09

Valores a *bold* indicam CT > 1

Alguns elementos químicos são translocados para a parte aérea (Quadro 4.6), exceptuando-se alguns elementos no tratamento controlo. No entanto, os contaminantes acumulam-se na raiz, com excepção do As e do Pb no controlo os quais são translocados para a parte aérea.

O Al, o Cu, o Mn e o Mo, são retidos na raiz em todos os tratamentos aplicados (CT < 1), ou seja, o *Cistus salviifolius* transloca pouco estes elementos químicos para as folhas. Ao contrário do referido por Abreu *et al.* (2012a), para a mesma espécie, o Mn foi retido nas raízes. A baixa concentração de Mo nas folhas do tratamento controlo pode dever-se a uma influência do pH do solo (Kabata-Pendias e Pendias, 2001; Abreu *et al.*, 2012a) ou a um efeito antagónico do Fe, o qual reduz a translocação de Mo (Srivastava e Gupta, 1996; Abreu *et al.*, 2012a).

Alguns elementos são translocados para a parte aérea no tratamento controlo e são retidos nas raízes nos restantes tratamentos, tal é o caso do As, Fe e Pb. No caso do As e do Pb, o facto de não serem translocados para a parte aérea poderá dever-se a um mecanismo de defesa o qual inibe a translocação a partir de um certo nível de absorção (Abreu *et al.*, 2012a; Freitas *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012). O ferro no tratamento controlo foi translocado mais intensamente (CT = 1,33) para a parte aérea do *C. salviifolius*. No entanto, nos tratamentos M.O. e cinza+M.O. a translocação foi limitada ($\leq 0,1$).

De acordo com o Quadro 4.6, os elementos B, Ca, Mg, P e Zn, são retidos nas raízes no tratamento controlo e são translocados para a parte aérea nos restantes tratamentos. As elevadas concentrações de Ca e Mg na parte aérea são consideradas adequadas para um desenvolvimento vegetativo saudável (Varennnes, 2003). Grandes concentrações de Zn no solo, podem ter um papel importante na translocação deste elemento químico para a parte aérea no *Cistus salviifolius* (Abreu *et al.*, 2012a; Abreu *et al.*, 2012b). No entanto nas plantas analisadas as concentrações de Zn na parte aérea estão dentro da gama considerada normal nos tratamentos com matéria orgânica.

Quanto aos macronutrientes translocados para a parte aérea, verificou-se que: o B e o Ca foram translocados para a parte aérea apenas nos tratamentos que possuem M.O. e o K e o Na foram translocados também para a parte aérea nos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O.. Estes elementos foram translocados para a parte aérea da planta, pois são macronutrientes essenciais à planta (Varennnes, 2003).

4.3.6 Coeficiente de acumulação

O coeficiente de acumulação (CA) caracteriza a capacidade de absorção e posterior acumulação de um elemento químico na parte aérea planta. Deste modo, para que as plantas sejam consideradas acumuladoras têm de possuir um coeficiente de acumulação

solo-planta superior a um (Abreu *et al.*, 2012a). Os valores obtidos encontram-se no Quadro 4.7 entrando em consideração com as concentrações do elemento na parte aérea da planta e da fracção total no solo.

Quadro 4.7 - Coeficiente de acumulação dos elementos químicos no *Cistus salviifolius* nos tratamentos controlo, cinza, M.O. e cinza+M.O.

	Controlo	Cinza	M.O.				Cinza+M.O.			
	1	4	9	10	11	12	13	14	15	16
Al	0,05497	0,00395	0,00487	0,00171	0,00251	0,00169	0,00280	0,00129	0,00160	0,00235
As	0,06669	0,00045	0,00035	0,00042	0,00019	0,00020	0,00035	0,00019	0,00031	0,00042
Ca	25,15393	52,88927	19,24636	24,69570	17,40900	24,20359	22,08353	18,41455	15,91803	22,73940
Cu	0,34963	0,03488	0,01006	0,01101	0,00152	0,01001	0,00848	0,00785	0,00151	0,00866
Fe	0,05043	0,00062	0,00045	0,00042	0,00015	0,00023	0,00030	0,00019	0,00028	0,00040
K	0,92828	1,27377	1,32353	1,30189	1,31456	1,53932	1,43148	1,03010	1,30604	1,22059
Mg	3,76126	5,08450	3,65351	3,95892	3,51406	4,61465	4,63482	3,79405	2,94512	4,11454
Mn	1,00461	10,81612	3,87040	1,07956	0,82276	0,66884	0,61665	0,64148	0,48216	0,53614
Mo	0,36075	0,08107	0,22014	0,17261	0,13310	0,19483	0,08076	0,09532	0,10066	0,17969
Na	13,62737	1,37610	0,84166	0,71649	0,89224	1,13436	1,08185	0,78614	0,78574	1,40330
Pb	0,08446	0,00035	0,00010	0,00024	0,00005	0,00008	0,00022	0,00011	0,00024	0,00031
Zn	3,03728	0,96661	0,80051	0,73822	0,37931	1,37890	0,63768	0,32142	0,24021	0,37452

1,2,3,4 indicam os vasos analisados; valores a **bold** indicam CA > 1

A maioria dos elementos químicos potencialmente tóxicos para as plantas (Al, As e Pb) não são acumulados pelo *C. salviifolius* em nenhum dos tratamentos aplicados. Santos *et al.* (2012) referem que o *Cistus ladanifer* não é acumulador nem de As nem Cu, o mesmo verificaram Abreu *et al.* (2012a; 2012b) para o *Cistus salviifolius*. É ainda referido por Abreu *et al.* (2012a), que o *C. salviifolius* também não é acumulador de Pb, facto que se pode constatar no Quadro 4.7.

O Ca e Mg foram acumulados pelo *C. salviifolius* em todos os tratamentos aplicados, os quais são considerados adequados para um desenvolvimento vegetativo saudável (Varennas, 2003). No tratamento controlo o K não é acumulado ao contrário do que se observa nos restantes tratamentos. O Mn foi acumulado pelo *C. salviifolius* nos tratamentos controlo, cinza e M.O., e não foi acumulado no tratamento cinza+M.O.. De uma maneira geral, o Zn apenas é acumulado no tratamento controlo, pois possui uma relação entre a concentração de Zn nas folhas com a concentração total de Zn no solo superior a um.

4.3.7 Coeficiente de bioacumulação

O coeficiente de bioacumulação (CB) reflecte a capacidade da planta em absorver um elemento do solo quando este se encontra na fracção disponível avaliada por extracção química do solo utilizando uma solução aquosa de extracção, que neste estudo corresponde

à solução de Rhizzo. Deste modo, quando são considerados elementos vestigiais e à falta de sinais de fitotoxicidade, o CB representa o nível de tolerância da planta para um elemento potencialmente tóxico (Santos *et al.*, 2009). Os valores obtidos encontram-se no Quadro 4.8.

Quadro 4.8 - Coeficiente de bioacumulação dos elementos químicos no *Cistus salviifolius* nos tratamentos controlo, cinza, M.O. e cinza+M.O. (n = 4, excepto tratamento controlo e cinza n = 1)

	Controlo 1	Cinza 4	M.O.				Cinza+M.O.			
			9	10	11	12	13	14	15	16
Al	62,96	2,77	0,65	0,14	0,68	0,24	0,25	0,09	0,34	0,55
As	2418,43	7,18	3,27	2,51	1,77	1,27	2,81	1,22	2,25	2,80
Ca	279,17	66,73	5,63	4,35	2,43	5,18	6,41	3,56	2,62	3,56
Cu	66,44	7,91	6,81	7,38	1,08	6,89	6,00	5,47	1,05	6,01
Fe	725,82	5,67	0,64	0,56	0,52	0,41	0,48	0,25	0,78	1,21
K	285,23	146,72	45,69	46,26	55,27	56,17	41,53	31,96	53,55	57,90
Mg	433,49	122,47	146,48	103,81	248,64	204,64	156,07	93,35	172,36	417,22
Mn	111,12	176,30	12,32	2,99	1,76	1,30	1,84	1,82	1,35	1,45
Mo	87,20	20,79	90,21	51,63	24,72	29,47	66,38	48,87	31,04	27,42
Na	347,85	32,71	3,99	3,42	5,63	5,61	4,66	3,66	5,68	11,58
Pb	43,74	1,77	1,51	3,51	0,77	1,12	3,39	1,66	3,53	4,58
Zn	123,85	89,62	40,40	12,29	4,16	12,12	22,40	22,24	12,43	15,50

Valores a *bold* indicam CB > 1

Através do Quadro 4.8, verifica-se que a planta possui uma boa capacidade em translocar e acumular na parte aérea os elementos disponíveis no solo para a parte aérea. Nos tratamentos com correctivos o CB é menor, pois as concentrações da parte aérea não são tóxicas.

4.3.8 Quantificação de clorofilas e carotenóides

É de referir que a quantificação de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e de carotenóides não foi realizada no tratamento controlo devido à escassa quantidade de amostra.

4.3.8.1 Clorofila a, clorofila b e clorofila total

Clorofila é a designação dada a um grupo de pigmentos fotossintéticos das plantas, existindo em duas formas: clorofila *a* e clorofila *b*. Os valores das concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total constam da Figura 4.4. Estas não diferem significativamente nos diferentes tratamentos aplicados, sendo de notar que os valores médios mais elevados se encontram no tratamentos cinza+M.O..

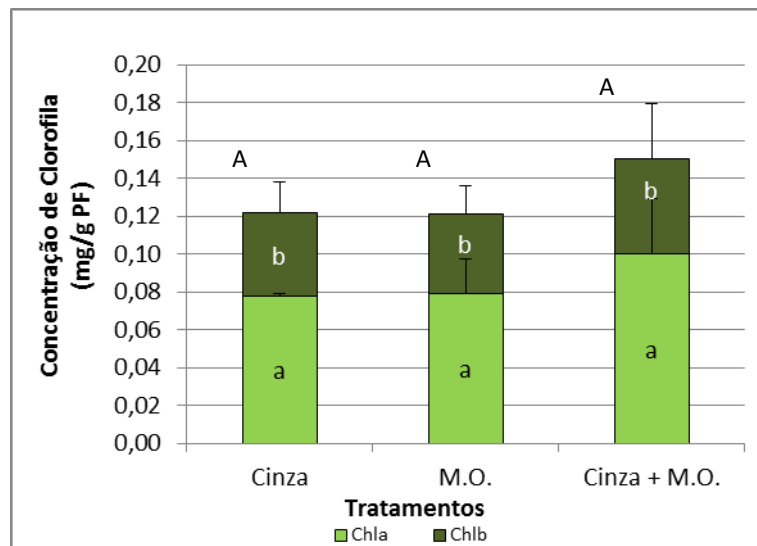


Figura 4.4 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de clorofila a, clorofila b e clorofila total nas folhas de *Cistus salviifolius* nos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas (letras dentro das caixas correspondem à clorofila a ou b; letras fora das caixas correspondem à clorofila total)

Os teores de clorofila total obtidos nos diferentes tratamentos com correctivos excedem o valor máximo obtido por Nuñez-Oliveira *et al.* (1996) para folhas novas ($0,38-1,04 \pm 0,05-1,61$ mg/g PF) e maduras ($0,39-1,12 \pm 0,06-1,75$ mg/g PF) de *Cistus ladanifer*. Neste ensaio, a quantificação de clorofilas foi realizada com folhas novas e maduras. Quando comparados com os valores obtidos com os de Nuñez-Oliveira *et al.* (1996), verifica-se que a concentração de clorofila total obtida nos diferentes tratamentos ($0,123 \pm 0,018$ mg/g PF – Cinza; $0,122 \pm 0,030$ mg/g PF – M.O.; $0,152 \pm 0,056$ mg/g PF – Cinza+M.O.) é inferior. Quanto à proporção clorofila a/clorofila b, os tratamentos M.O. e cinza+M.O. encontram-se dentro do limite considerado por Nuñez-Oliveira *et al.* (1996) para folhas maduras de *Cistus ladanifer* ($1,88-3,02 \pm 0,008-4,47$), ao contrário do tratamento cinza, o qual se encontra um pouco abaixo. Uma vez que não existem dados referentes ao tratamento controlo, não é possível comparar a concentração de clorofila a e b.

Quando correlacionadas as concentrações de clorofila a, clorofila b e clorofila total com os elementos químicos nas folhas, obtiveram-se os seguintes resultados: para a clorofila a, não foram encontradas correlações no tratamento cinza; no tratamento com M.O. obteve-se correlação com o Mn ($r = 0,926$) e no tratamento cinza+M.O. com o B ($r = 0,999$) e com o Cu ($r = 0,867$). Para a clorofila b, não se observaram correlações no tratamento cinza; no tratamento cinza+M.O. está correlacionada com o Zn ($r = 0,970$). Para a clorofila total, esta não está correlacionada com nenhum elemento químico no tratamento cinza; no tratamento M.O. está correlacionada com o Mn ($r = 0,884$) e com o Mo ($r = 0,948$), e no tratamento cinza+M.O. com o B ($r = 0,957$) e com o Zn ($r = 0,881$).

O teor de clorofila *a*, *b* ou total pode ser influenciado pela presença de elementos químicos potencialmente tóxicos. No entanto, as correlações obtidas evidenciam que as concentrações de elementos tóxicos na parte aérea não parecem provocar a degradação dos diferentes tipos de clorofila.

4.3.8.2 Carotenóides

Os carotenóides nas plantas podem desempenhar uma acção protectora dos pigmentos clorofilinos quando na presença de condições de stresse. Os resultados obtidos para este pigmento nas folhas de *Cistus salviifolius* constam da Figura 4.5.

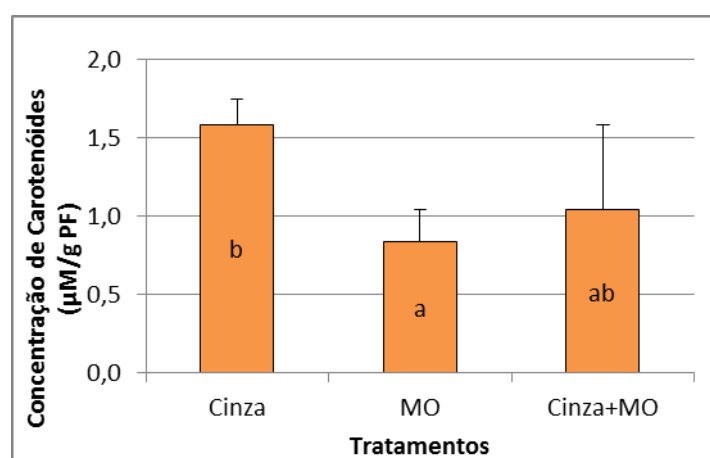


Figura 4.5 - Concentração (Média \pm DP, $n=4$) de Carotenóides nas folhas de *Cistus salviifolius* nos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

As concentrações de carotenóides nas plantas do tratamento M.O. diferem significativamente das do tratamento cinza, sendo neste último que se encontra a concentração média de carotenóides mais elevada. No entanto, uma vez que não existe amostra para o tratamento controlo, não é possível comparar os resultados obtidos. Deste modo, não é possível verificar se no controlo a concentração seria mais alta ou mais baixa em relação aos resultados obtidos. Apenas pode ser afirmado que no tratamento cinza o teor de carotenóides é mais elevado, quando comparado com os restantes tratamentos.

Quando correlacionado o teor de carotenóides com os elementos químicos das folhas, obtiveram-se as seguintes correlações: no tratamento cinza+M.O. com o As ($r = 0,863$) e com o B ($r = 0,893$).

4.3.9 Quantificação de glutathionas, ascorbatos e peróxidos

A quantificação de glutathionas, ascorbatos e peróxidos não foi realizada no tratamento controlo devido à escassa quantidade de amostra.

4.3.9.1 Glutationas

A glutatona (GSH) é um tripéptido de baixa massa molecular, composta por glutamato, cisteína e glicina. Possuem um grupo tiol na cisteína, sendo muito abundantes, o que o torna o principal tampão redox intracelular (Ferreira e Abreu, 2007). A GSH tem a função de um antioxidante que actua para proteger as macromoléculas lábeis dos radicais livres e do peróxido de hidrogénio, as quais são formadas como consequência do stresse oxidativo (Alscher, 1989).

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.6. A concentração de GSH nas folhas e raízes de *C. salviifolius*, não difere significativamente entre tratamentos, em ambos os casos. Na parte aérea, o valor médio mais elevado pertence ao tratamento cinza+M.O. e o mais baixo ao tratamento M.O.. Nas raízes, O valor médio mais elevado foi obtido no tratamento cinza e o mais baixo no tratamento cinza+M.O..

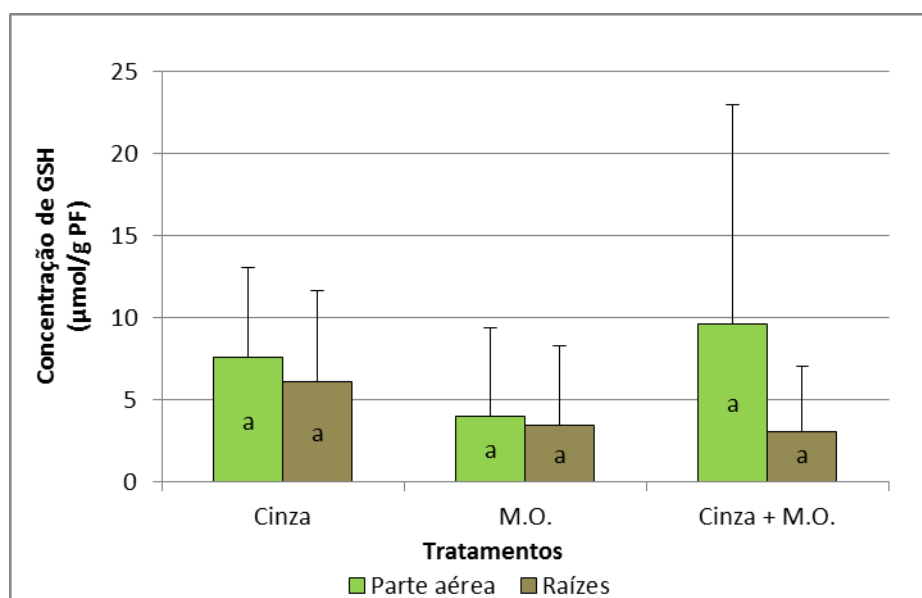


Figura 4.6 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Glutationas (GSH) nas folhas e nas raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Uma vez que não existem dados de referência do *C. salviifolius* relativamente às concentrações de GSH, utilizaram-se os dados obtidos por Carvalho *et al.* (2006), para a parte aérea de *Vitis vinífera* L. var. Touriga Nacional. Os valores obtidos por Carvalho *et al.* (2006) encontram-se entre 0,3-1,1 $\mu\text{mol/g PF}$. Quando comparados os dados obtidos com os valores de Carvalho *et al.* (2006), verifica-se que as concentrações obtidas na parte aérea de *C. salviifolius* são muito mais elevadas que os valores de *Vitis vinífera*. O aumento

da concentração em GSH poderá dever-se a um mecanismo de defesa da planta como forma de protecção ao stresse oxidativo.

4.3.9.2 Ascorbato total

O ascorbato é um anti-oxidante que protege as células das plantas contra o stresse oxidativo (Horemans *et al.*, 2000; Smirnoff, 1996). O stresse oxidativo pode ser causado pelo metabolismo aeróbio, da fotossíntese ou de uma gama de poluentes (Smirnoff, 1996). A exposição a ambientes extremos e poluentes pode causar stresse oxidativo nas plantas (Smirnoff, 1995), ocorrendo um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas), as quais são condições essenciais para o funcionamento normal do organismo (Ferreira e Abreu, 2007).

Os resultados obtidos para o ascorbato encontram-se na Figura 4.7. As concentrações de Asa nas plantas do tratamento cinza, tanto na parte aérea como nas raízes, diferem significativamente dos tratamentos M.O. e cinza+M.O..

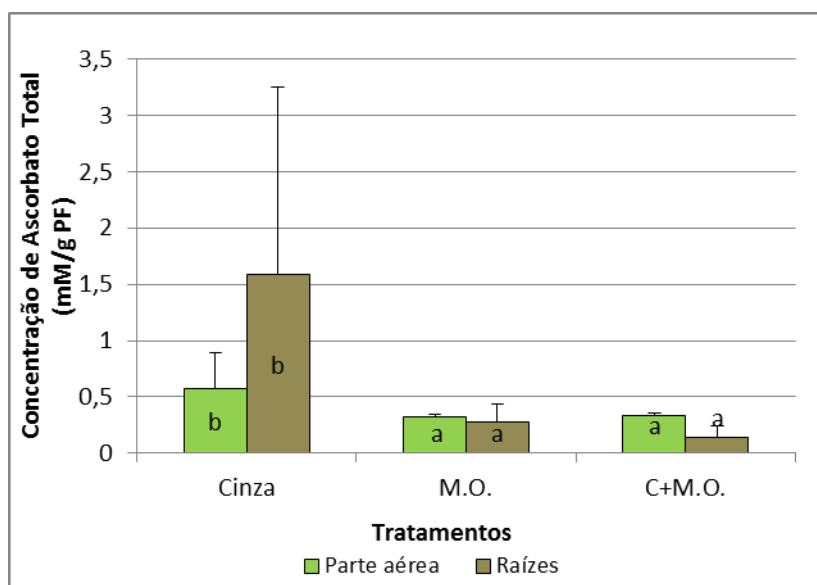


Figura 4.7 - Concentração (Média \pm DP, n=4) de Ascorbato total nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Não existindo dados de referência para o *C. salviifolius* relativamente às concentrações de AsA, utilizaram-se também os dados obtidos por Carvalho *et al.* (2006), para a parte aérea de *Vitis vinífera* L. var. Touriga Nacional. Os valores obtidos por Carvalho *et al.* (2006) encontram-se entre 1,2-4,0 $\mu\text{mol/g}$ PF. Comparando estes valores com os obtidos para o *C. salviifolius*, este apresenta concentrações muito mais elevadas. Estes valores poderão evidenciar que a aplicação de correctivos ao aumentar a disponibilidade de

elementos químicos nas folhas, a qual pode aumentar a concentração de AsA na planta, melhorando o desempenho da protecção da planta ao stresse oxidativo.

4.3.9.3 Peróxidos

Os peróxidos estão envolvidos na oxidação de compostos que estão contidos nas paredes celulares das folhas e das raízes das plantas. A concentração de peróxido oxidado produz resultados reprodutíveis no intervalo de concentração de H_2O_2 de 0,1 a 1 μM . Assim, nas plantas do tratamento cinza, tanto na parte aérea como nas raízes, difere significativamente dos tratamentos M.O. e cinza+M.O. (Figura 4.8).

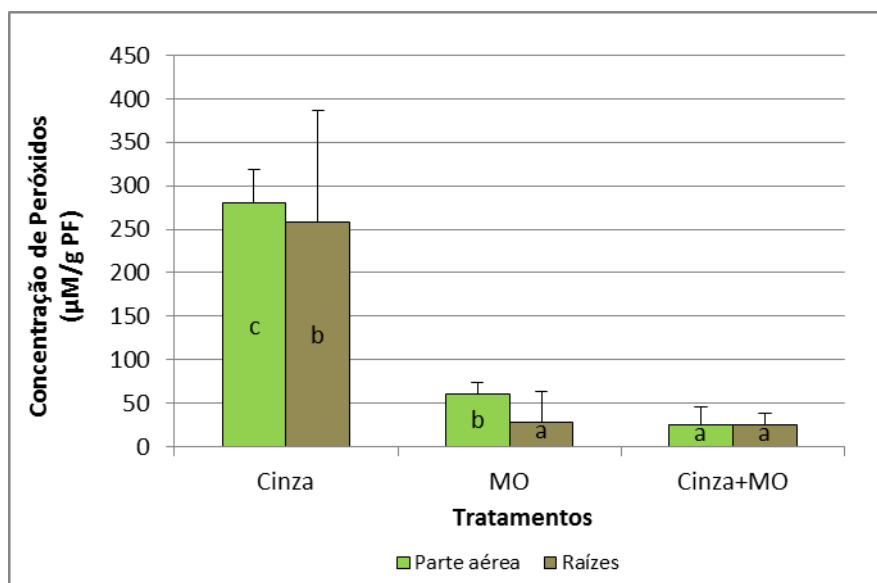


Figura 4.8 - Concentração (Média \pm DP, $n=4$) de Peróxidos na parte aérea e raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Uma vez que não existem dados de referência do *C. salviifolius* relativamente às concentrações de peróxidos, utilizaram-se de novo os dados obtidos por Carvalho *et al.* (2006), para a parte aérea de *Vitis vinífera* L. var. Touriga Nacional. Os valores obtidos por Carvalho *et al.* (2006) encontram-se entre 0,1-0,3 $\mu mol/g$ PF. As concentrações obtidas na parte aérea de *C. salviifolius* são elevadíssimas quando comparadas com os valores de referência. Tal como evidenciado nas GSH e na AsA, a aplicação de correctivos poderá ter determinado a protecção da planta ao stresse oxidativo que é maior no tratamento só com cinza onde as plantas tiveram maiores problemas de desenvolvimento quando comparado com os restantes tratamentos. A comparação com as plantas do tratamento controlo seria fundamental para se retirarem conclusões mais fundamentadas.

Foi correlacionada a concentração de peróxidos com a concentração dos elementos químicos na parte aérea das plantas. As plantas do tratamento cinza não puderam ser correlacionadas pois o número de amostras é muito baixo para poder realizar correlações. No entanto, as plantas dos tratamentos com M.O. não apresentaram qualquer correlação com os elementos.

As concentrações de elementos químicos na parte aérea e nas raízes não influenciaram negativamente as concentrações de glutatonas, ascorbatos e peróxidos demonstrando uma boa reacção por parte da planta na presença de elementos químicos. No entanto, seria necessário possuir os dados relativos ao tratamento controlo para que fosse possível tirar conclusões mais específicas.

4.3.10 Quantificação de actividade enzimática de Catalase e Peroxidase

Quando as plantas se encontram sob stresse oxidativo podem produzir ou induzir a actividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), a peroxidase (POD) e outros constituintes não-enzimáticos (peróxidos, GSH e ascorbato total), que removem e neutralizam as espécies reactivas de oxigénio (Shah *et al.*, 2001; Sigh *et al.*, 2004). As enzimas podem estar presentes em duas formas principais activas dentro das células das plantas: formas solúveis, as quais se encontram no meio aquoso da célula; ou ligados ionicamente à parede celular através de interacções electrostáticas (Santos *et al.*, 2009).

4.3.10.1 Actividade Enzimática da Catalase

A actividade enzimática da catalase (CAT) em ambas as fracções, solúvel e iónica, está representada na Figura 4.9. Na fracção solúvel a actividade da CAT é maior na parte aérea do que na raiz. Santos *et al.* (2009), referem que o *Cistus ladanifer* L. apresenta valores altos da actividade da CAT também na parte aérea desta espécie.

A actividade da CAT na fracção solúvel da parte aérea das plantas dos tratamentos M.O. e cinza+M.O difere significativamente do tratamento cinza. A actividade da CAT na parte aérea das plantas dos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O. é muito superior ao valor de referido por Santos *et al.* (2009; 45 – 75 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g PF}$) para *Cistus ladanifer*. Nas raízes, e ainda na fracção solúvel, não existem diferenças significativas entre tratamentos. Quanto à fracção iónica na parte aérea das plantas, não foram identificadas diferenças significativas entre tratamentos. A actividade da CAT nas raízes das plantas do tratamento cinza difere significativamente da dos tratamentos que possuem M.O.. Comparando a actividade da CAT na parte aérea do *C. salviifolius* com os valores referidos por Santos *et al.* (2009; 5 – 100 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g PF}$) para *C. ladanifer*, verifica-se que os valores obtidos para todos os tratamentos se encontram acima da referida gama.

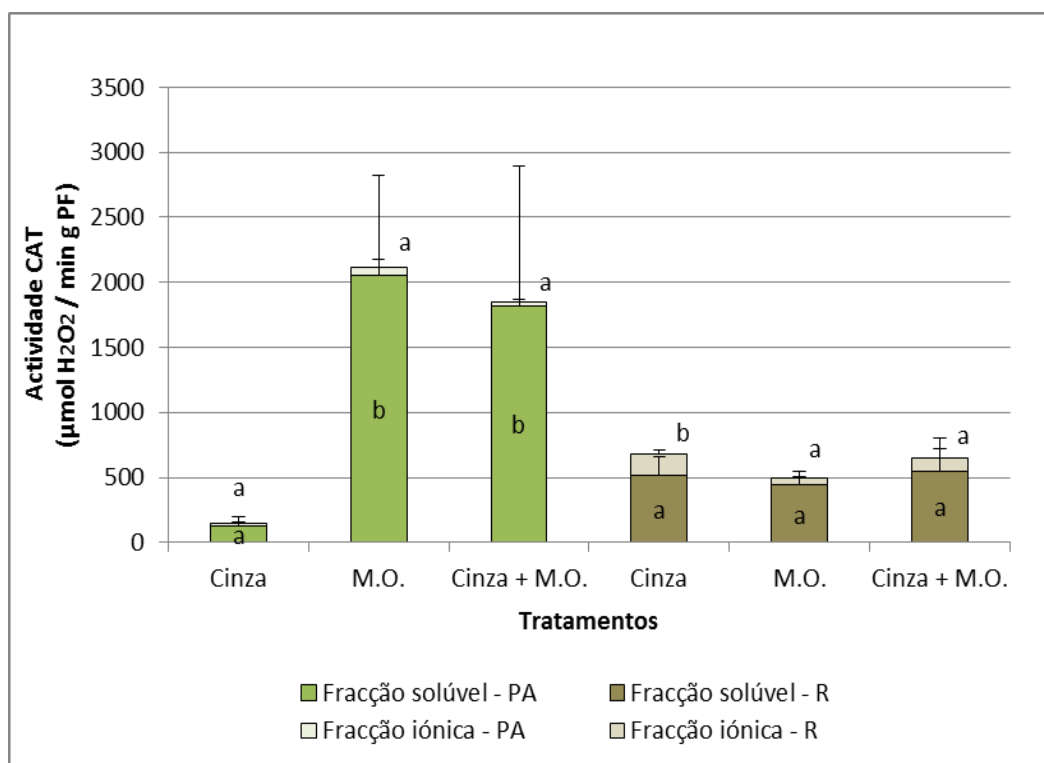


Figura 4.9 - Actividade enzimática (Média \pm DP, n=4) de Catalase (CAT) nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas

Foram correlacionados os valores de actividade de CAT de ambas as fracções (solúvel e iónica) na parte aérea e nas raízes do *C. salviifolius* com as concentrações dos elementos químicos, também na parte aérea e nas raízes. O tratamento cinza foi excluído, por o número de amostras ser muito baixo.

A actividade de CAT na fracção solúvel da parte aérea das plantas está correlacionada, no tratamento cinza+M.O., com o Cu ($r = 0,960$). Esta correlação positiva da actividade CAT com o Cu significa que a concentração de Cu não influencia a actividade da CAT. Ainda na fracção solúvel, mas nas raízes, a actividade CAT não está correlacionada com as concentrações de qualquer elemento químico nos dois tratamentos. Contrariamente ao verificado por Santos *et al.* (2009), não se observou nenhuma correlação significativa entre as concentrações de Zn e de As nas folhas e a actividade CAT na fracção solúvel

Na fracção iónica das raízes, há um aumento da actividade CAT nos tratamentos cinza e cinza+M.O., quando comparada com a fracção iónica da parte aérea.

4.3.10.2 Actividade Enzimática da Peroxidase

Na Figura 4.10 apresentam-se os valores da actividade enzimática da peroxidase (POD) em ambas as fracções, solúvel e iónica, nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento. A actividade de POD na fracção solúvel é ligeiramente mais

elevada nas raízes do que na parte aérea. Os valores da actividade de POD para a fracção solúvel na estação Primavera obtidos por Santos *et al.* (2009), para *Cistus ladanifer* L., são 10 – 13 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g PF}$, a qual é muito inferior aos valores obtidos nos diferentes tratamentos, tanto na parte aérea como nas raízes de *C. salviifolius*. Quanto à fracção iónica, a actividade POD também apresenta valores muito superiores na parte aérea e nas raízes do *C. salviifolius*, quando comparados com os valores obtidos por Santos *et al.* (2009) (10 – 45 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g PF}$) para outra espécie de *Cistus*.

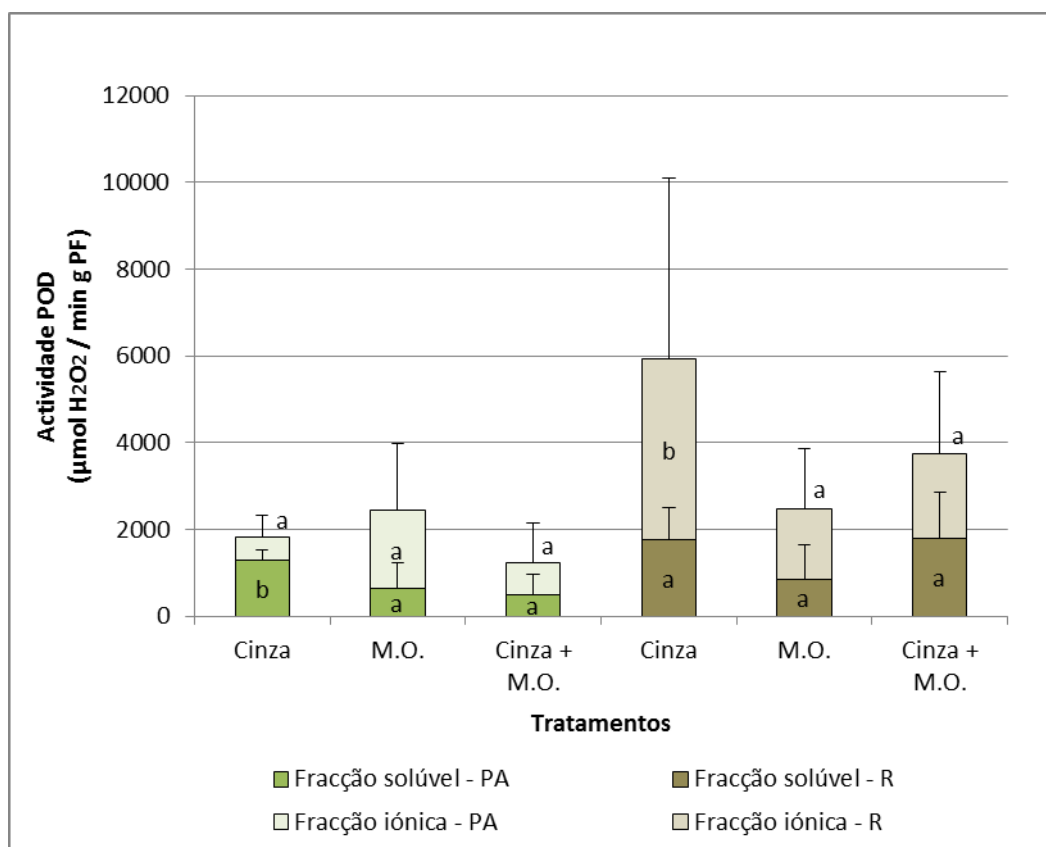


Figura 4.10 - Actividade enzimática (Média \pm DP, n=4) de Peroxidase (POD) nas folhas e raízes de *Cistus salviifolius* dos diferentes tipos de tratamento (Cinza, M.O. e Cinza+M.O.) no final do ensaio.

Letras diferentes indicam diferenças significativas

À semelhança da actividade da CAT, o tratamento cinza não foi correlacionado com os elementos químicos, na actividade da POD, pois o número de amostras é muito baixo para poder realizar correlações.

Na parte aérea, a actividade da POD na fracção solúvel é maior nas plantas do tratamento cinza e este difere significativamente da actividade da POD nos tratamentos com M.O.. No tratamento M.O. obteve-se correlação significativa entre os valores da actividade da POD e as concentrações de Zn ($r = 0,936$), estas podem induzir a actividade da POD de modo a proteger a planta do stresse oxidativo. Já no tratamento cinza+M.O. em que as

concentrações de zinco são mais baixas na parte aérea do que no tratamento M.O. não se obteve correlação significativa. Para este tratamento também não se obtiveram correlações significativas com outros elementos químicos potencialmente tóxicos. A actividade de POD na fracção solúvel das raízes não apresenta diferenças significativas entre os tratamentos aplicados.

A actividade de POD na fracção iónica da parte aérea do *C. salviifolius* não difere significativamente entre tratamentos. Na parte aérea das plantas, a actividade POD na fracção iónica tem concentrações médias superiores à da fracção solúvel (Fig, 4.10) nos tratamentos com matéria orgânica. Nas plantas do tratamento M.O. não foram identificadas correlações entre as concentrações da actividade POD e as concentrações de elementos químicos potencialmente tóxicos. Nas raízes, a actividade da POD da fracção iónica das plantas do tratamento cinza difere significativamente do das plantas dos tratamentos com M.O.. Poderá significar, que as raízes das plantas do tratamento cinza contêm concentrações elevadas de elementos químicos potencialmente tóxicos, o que induz a actividade da POD (como não se dispunha de quantidade suficiente de raízes, estas não foram analisadas quimicamente). No tratamento cinza+M.O. os elementos químicos potencialmente tóxicos que podem induzir a actividade da POD pois obtiveram-se correlações significativas entre as concentrações de Mn e Zn e as da actividade da POD (Mn ($r = 0,973$), Zn($r = 0,955$)). Esta correlação com o Zn também foi observada por Santos *et al.* (2009) em *C. ladanifer*.

No geral, observou-se uma maior actividade enzimática na fracção iónica nas raízes, onde os elementos químicos estão acumulados de modo a reduzir o efeito tóxico dos elementos químicos na parede celular (Santos *et al.*, 2009).

As concentrações de elementos químicos na parte aérea e nas raízes não inibiram a actividade enzimática da CAT e da POD demonstrando uma boa reacção por parte da planta na presença de elementos químicos. No entanto, seria necessário possuir os dados relativos ao tratamento controlo para que fosse possível tirar conclusões mais específicas.

5 Conclusões

Os objectivos deste trabalho foram: estudar a fitoestabilização de um solo desenvolvido sobre materiais de *gossan*, utilizando correctivos juntamente com plantas autóctones adaptadas a ambientes extremos (*Cistus salviifolius* L.).

A utilização de correctivos promoveu uma melhoria considerável das características do solo:

- Todos os tratamentos com correctivos levaram ao aumento dos valores de pH, EC, e das concentrações de P e K extraíveis no solo. O tratamento cinza+M.O foi o tratamento onde a melhoria destas características foi mais acentuada. No entanto, foi o tratamento onde apenas se aplicou M.O. aquele que apresentou concentrações mais elevadas para o C orgânico e para o azoto total.
- O solo inicial apresentava elevada acidez (pH 3,5), baixo teor de carbono orgânico, bem como baixos valores de azoto e fertilidade baixa de fósforo e potássio extraíveis. As concentrações de As, Cu e Pb excedem o Valor Máximo Admissível, indicando claramente contaminação destes elementos.
- As concentrações da fracção disponível dos elementos químicos no solo eram relativamente baixas, não excedendo 8,7 % do valor total na 1ª amostragem, com excepção do Mn cuja concentração da fracção disponível estava entre 16,4 e 16,7 % nos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O.. Na 2ª Amostragem, as concentrações dos elementos na fracção disponível não excediam 8,4 % do valor total, com excepção do Mn nos tratamentos com M.O. (21,2 - 24,84%). Em ambas as amostragens a fracção disponível do As é inferior a 0,03 % da concentração total e a do Pb inferior a 0,1 % do total. Tanto na 1ª amostragem como na 2ª Amostragem, observou-se um decréscimo da concentração dos elementos químicos na fracção disponível.

A resposta fisiológica do *C. salviifolius* foi positiva, relativamente à aplicação de correctivos ao solo, concluindo-se o seguinte:

- A aplicação de correctivos ao solo aumentou a germinação de *C. salviifolius*, sendo a taxa de germinação mais alta no tratamento M.O.;
- Os tratamentos com M.O. e cinza+M.O. promoveram o maior desenvolvimento vegetativo das plantas sendo os valores mais elevados da massa fresca, tanto da parte aérea como das raízes, os obtidos no tratamento cinza+M.O.;

- A percentagem de água nas plantas era muito elevada em todos os tratamentos quando comparado com o tratamento controlo, sendo o tratamento cinza o que apresentou o valor mais elevado.
- Foram analisados os elementos químicos na parte aérea e nas raízes de *C. salviifolius*, sendo dada particular ênfase aos elementos químicos potencialmente tóxicos:
 - *Arsénio*: as concentrações de As na parte aérea das plantas, nos tratamentos com correctivos não alcançam os níveis tóxicos para as plantas. As raízes das plantas do tratamento controlo possuíam concentrações muito elevadas de As quando comparadas com as concentrações no mesmo órgão das plantas dos tratamentos M.O. e cinza+M.O.;
 - *Boro*: na parte aérea das plantas dos tratamentos com M.O., os valores de B encontram-se dentro da gama considerada crítica para as plantas. No entanto, no tratamento controlo, as concentrações de B na parte aérea excedem em cerca de 48,6 % do limite considerado tóxico. Quanto à concentração de B nas raízes, as plantas do tratamento controlo apresentaram concentrações muito mais elevadas do que as dos tratamentos com M.O.. Sem a aplicação de correctivos ao solo, o B tem tendência a acumular-se na parte aérea das plantas que aí cresceram;
 - *Cobre*: na parte aérea das plantas do tratamento controlo as concentrações de Cu ultrapassam o limite considerado tóxico. Quanto aos restantes tratamentos, as plantas possuem concentrações consideradas normais. No entanto, os valores das concentrações de Cu nas raízes são, em todos os tratamentos mais elevados do que os da parte aérea. Quando comparadas entre tratamentos, as concentrações de Cu nas plantas do tratamento controlo são significativamente diferentes das das plantas dos tratamentos com M.O.; as plantas do tratamento controlo apresentam as concentrações mais elevadas e as do tratamento cinza+M.O. as mais baixas;
 - *Manganês*: os valores da concentração de Mn na parte aérea de *C. salviifolius* dos tratamentos controlo, M.O. e cinza+M.O. encontram-se dentro dos valores considerados normais para diversas espécies de plantas. No tratamento com cinza as concentrações de Mn excedem o limite anteriormente referido, podendo considerar-se fitotóxicas.,
 - *Molibdénio*: as concentrações de Mo são ligeiramente mais elevadas nas raízes do que na parte aérea de *C. salviifolius*. As concentrações de Mo na

parte aérea estão na gama considerada normal para as plantas. As concentrações de Mo nas raízes das plantas do tratamento controlo são muito elevadas quando comparadas com as concentrações dos tratamentos M.O. e cinza+M.O.;

- *Chumbo*: as concentrações de Pb da parte aérea das plantas dos tratamentos com correctivos não alcançam o limite considerado fitotóxico. No entanto, a concentração de Pb do tratamento controlo da parte aérea ultrapassa o limite considerado tóxico. A concentração de Pb nas raízes das plantas do tratamento controlo é mais elevada do que nos tratamentos M.O. e cinza+M.O.. Nestes tratamentos as concentrações de Pb nas raízes são muito superiores às da parte aérea. Embora o chumbo não seja facilmente disponível no solo, é absorvido e armazenado nas paredes das células das raízes;
- *Zinco*: as concentrações de Zn na parte aérea das plantas ultrapassam o valor considerado fitotóxico nos tratamentos controlo e cinza. A concentração de Zn nas raízes é mais baixa nos tratamentos com M.O. do que no tratamento controlo. O zinco é, no *C. salviifolius*, transportado maioritariamente para a parte aérea.

Na sua maioria os elementos químicos são translocados para a parte aérea, exceptuando-se alguns elementos no tratamento controlo. Os elementos químicos contaminantes acumulam-se na raiz com excepção do As e do Pb no controlo que são translocados para a parte aérea. O *C. salviifolius* não é uma espécie acumuladora de As, Cu, Mo e Pb. No entanto, no tratamento controlo esta espécie comporta-se como acumuladora de Zn e de Mn. A capacidade de acumulação deste último elemento também se verificou nas plantas dos tratamentos com cinza e duas amostras de M.O.. O *C. salviifolius* possui um nível de tolerância bastante elevado relativamente aos elementos potencialmente tóxicos (As, Cu, Mn, Mo, Pb e Zn).

- A concentração de clorofila *a* e *b* é mais alta nas plantas do tratamento com correctivos cinza+M.O.. Porém, as plantas com maior concentração de carotenóides foram as do tratamento cinza.
- A concentração de Glutathionas não difere significativamente entre tratamentos, tanto na parte aérea como nas raízes.
- A concentração de Ascorbato Total é mais alta, tanto na parte aérea como nas raízes das plantas do tratamento com cinza, que é diferente dos outros dois tratamentos com correctivos.

- A concentração de Peróxidos, à semelhança do Ascorbato Total, é mais alta, tanto na parte aérea como nas raízes das plantas, no tratamento com cinza, que é diferente dos outros dois.
- A actividade da Catalase da parte aérea de *C. salviifolius* dos tratamentos cinza, M.O. e cinza+M.O. é bastante elevada. Nas raízes, não existem diferenças significativas entre tratamentos. Os valores da actividade CAT do *C. salviifolius* estão dentro da gama dos de *C. ladanifer*.
- A actividade enzimática da Peroxidase nas plantas (parte aérea e raiz) dos diferentes tratamentos e para as fracções solúvel e iónica, são muito altos quando comparados com os valores referidos na bibliografia para *C. ladanifer*. O tratamento que mais influenciou a actividade POD, em ambas as fracções, foi o tratamento cinza.
- A actividade POD da fracção iónica na parte aérea das plantas é superior à actividade POD da fracção solúvel.

Face aos resultados obtidos, pode considerar-se que a utilização de correctivos melhora a qualidade do solo e proporciona uma resposta muito positiva do *C. salviifolius* perante concentrações elevadas de elementos químicos potencialmente tóxicos nos solos, podendo contribuir para a recuperação de solos degradados, em particular dos solos de áreas mineiras que apresentam contaminação multielementar.

A escolha de uma tecnologia de remediação depende sempre da natureza dos contaminantes, das características do local e da dimensão da contaminação (Adriano *et al.*, 1998). Dado que a dimensão da contaminação na Mina de S. Domingos é elevada e sendo o *C. salviifolius* uma espécie autóctone relativamente abundante, a aplicação de correctivos ricos em matéria orgânica, neste caso específico M.O. ou cinza+M.O., permitirá um melhor desenvolvimento do *C. salviifolius* e diminuirá a concentração de elementos químicos no solo, sendo deste modo, uma opção economicamente viável e mais aceite pela população. Ainda assim, é necessário continuar a estudar e identificar novas espécies de plantas adaptadas a estes meios extremos de modo a que possam contribuir para a reabilitação destes solos, contribuindo para a melhoria das suas características físico-químicas e minimizar a erosão hídrica e eólica.

6 Referências Bibliográficas

- Abreu, M.M, Santos, E.S., Anjos, C., Magalhães, M.C.F., Nabais, C., 2009a. Lead uptake capacity of *Cistus* plants growing in mining areas, *Revista de Ciências Agrárias* 32, 170-181.
- Abreu, M.M., Santos, E.S., Magalhães, M.C.F., Nabais, C., 2009b. Arsenic containing phases in soils from São Domingos mining area and in non-contaminated soils from Pomarão and Serra do Caldeirão, *Revista de Ciências Agrárias* 32, 155-169.
- Abreu, M.M., Magalhães, M.C.F., 2009c. Phytostabilization of soils in mining areas. Case studies from Portugal, in Aachen, L., Eichmann, P. (Eds.), *Soil remediation*, Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 297-344.
- Abreu, M.M, Baptista, M.J., Magalhães, M.C.F., Matos, J.X., 2010. Acid Mine Drainage in the Portuguese Iberian Pyrite Belt. In Brock C. Robinson (Ed.), *Mine drainage and Related problems*. Nova Science Publishers, Inc. NY. 71-118. ISBN: 978-1-60741-285-4.
- Abreu, M.M., Santos, E.S., Magalhães, M.C.F., Fernandes, E., 2012a. Trace elements tolerance, accumulation and translocation in *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine areas, *Journal of Geochemical Exploration* 123, 52-60.
- Abreu, M.M., Santos, E.S., Ferreira, F., Magalhães, M.C.F., 2012b. *Cistus salviifolius* a promising species for mine wastes remediation, *Journal of Geochemical Exploration* 113, 86-93.
- Activation Laboratories, 2012. 1H - Total Digestion—ICP, INAA. Disponível em: <http://www.actlabs.com/page.aspx?page=506&app=226&cat1=549&tp=12&lk=no&menu=64> , acessado a 19/09/2012.
- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals, Springer-Verlag, New York.
- Adriano, D.C., Chlopecka, A., Kaplan, D.I., 1998. Role of soil chemistry in soil remediation and ecosystem conservation. p. 361-386. In: *Soil Chemistry and Ecosystem Health*, St. Louis, MO.
- Aldrich, M.V., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L., 2007. Examination of arsenic (III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis* spp.) using X-ray absorption spectroscopy. *Science of the Total Environment* 379, 249–255.
- Alscher, R.G., 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum* 77, 457 – 464.

- Alvarenga, P., Fernandes, R.M., Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., Cunha-Queda, A.C., 2011. Utilização de *Lolium Perenne* L. na fitoestabilização controlada de solos degradados por actividades mineiras. *Revista de Ciências Agrárias* 34, 117-130.
- Alves, H.M., 1998. Mina de S. Domingos: Entre o património construído e os projectos de musealização, *Seminário Museologia e Arqueologia Mineiras*, Lisboa, Actas, Pub. Do Museu do I.G.M, 49-55.
- Anderson, J., Chevone, B., Hess, J., 1992. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence. *Plant Physiology* 98, 501-508.
- Anjos, C., Magalhães, M.C.F., Abreu, M.M., 2012. Metal (Al, Mn, Pb and Zn) soils extractable reagents for available fraction assessment: Comparisson using plants, and dry and moist soils from the Braçal abandoned lead mine area, Portugal, *Journal of Geochemical Exploration* 113, 45-55.
- APEA, 2013. Cinzas de biomassa aproveitadas para produção de energia. Disponível em: <http://www.apea.pt/scid/webapea/defaultArticleViewOne.asp?articleID=2552&categoryID=740>, acedido a 21/03/2013.
- Arthur, E.L., Rice, P.J., Anderson, T.A., Baladi, S.M., Henderson, K.L.D., Coats, J.R., 2005. Phytoremediation – An overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 109-122.
- Baryla, A., Laborde, C., Montillet, J.-L., Triantaphylidès, C., Chagvardieff, P., 2000. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper, *Environmental Pollution* 109, 131-135.
- Baslar, S., Dogan, Y., Maert, H.H., 2001. A Study on the Soil-Plant Interactions of Some *Cistus* L. Species Distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany* 26, 149-159.
- Bleeker, P.M., Schat, H., Vooijs, R., Verkleij, J.A.C., Ernest, W.H.O., 2002. Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*, *New Phytologist* 157, 33-38.
- Bourrelie, P.H., Berthelin, J., Pédro, G., 1998. Dynamique des elements en traces dans les sols: Mobilité et tranferts vers les eaux souterraines et les plantes, contamination des sols par les elements en trace: Les risques et leur gestion, Lavoisier Tec&Doc., Paris, 440.
- Brümmer, G.W., 1986. Heavy metal species, mobility and availability in soils, The Importance of Chemical “Speciation” in Environmental Processes Dahlem Workshop Reports 33, 169-192.
- Burló, F., Guijarro, I., Carbonell-Barrachina, A.A., Valero, D., Martínez-Sánchez, F., 1999. Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1247-1253.

- Cabezudo, B., Navarro, T., Latorre, A., Caldeira, J., Orshan, G., 1992. Estudios fenomorfológicos en la vegetación del sur de España. I- *Cistus* L. *Acta Botanica Malacitana* 17, 229-237.
- Carvalho, L.C.; Vilela, B.J.; Vidigal, P.; Mullineaux, P.M., Amâncio, S., 2006. Activation of de Ascorbate-Glutathione Cycle in an early response of micropropagated *Vitis vinífera* L. explants transferred to ex vitro. *International Journal of Plant Sciences* 167, pp 759-77.
- CCME – Canada Council of Ministers of the Environment, 2007. Canada Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health: Summary Tables (Update 7.0, September 2007). CCME, Winnipeg, Canada.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology* 2, pp 764-817.
- Correndo, A.A, García, F.O., 2012. Concentración de nutrientes en planta como herramienta de diagnóstico: Cultivos extensivos, *Archivo Agronómico* #14
- Cruces, A.G., 2008. Técnicas de remediação. Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, ULHT. 17-21 pp.
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants, *Avance in Agronomy* 56, 55-114.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils, *Environmental Biotechnology* 13, 393-397.
- Dias, L.S., Dias, A.S., 1987. *Cistus ladanifer* L. (esteva), importância, gestão e ecologia, Departamento de Biologia, Universidade de Évora, II Congresso sobre o Alentejo.
- EcoCasa, sem ano. Lã de Rocha. Disponível em: http://ecocasa.pt/userfiles/file/La_de_Rocha.pdf, acedido a 21/03/2013.
- Ernst, W.H.O., 1996. Bioavailability of Heavy Metals and Descontamination of Soils by Plants, *Applied Chemistry* 11, 163-167.
- Faixa Piritosa Ibérica, sem ano. Faixa Piritosa Ibérica – Enquadramento Geológico In <http://www.mun-aljustrel.pt/default.aspx>. Acedido a 11 de Agosto de 2012 em http://cms.mun-aljustrel.pt/upload_files/client_id_2/website_id_2/Conheca_Aljustrel/Conheca-nos_Melhor/caracterizacao%20FPI.pdf.
- Feng, M.H., Shan, X.-Q., Zhang, S.; Wen, B. 2005. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137, pp 231-240.
- Ferreira, I.C.F.R, Abreu, R.M.V., 2007. Stress oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise / Ano IV, Nº 2*, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- Freitas, M.C., Pacheco, A.M.G., Anawar, H.M., Dionísio, I., Dung, H.M., Canha, N., Bettencourt, A., Henriques, F., Pinto-Gomes, C.J., Capelo, S., 2009. Determination of

- phytoextraction potential of plant species for toxic elements in soils of abandoned sulphide-mining areas. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 282, 21–27.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications, *Environmental International* 30, 65-72.
- Hiscox, J.D., Israelstam, G.F., 1978. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57, 1332-1334.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H., 2000. Ascorbate function and associates transport systems in plants, *Plant Physiology Biochemistry*. 38, 531-540.
- Hu, H., Brown, P. H., 1997. Absorption of boron by plant roots, *Plant Soil* 193, 49-58.
- Hughes, M. K., Lepp, N. W., Phipps, D. A., 1980. Aerial heavy metal pollution and terrestrial ecosystems, *Advances In Ecological. Research* 11, 217-327.
- INIA – LQARS, 2000. Manual de Fertilização das culturas. Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva (Ed.), Lisboa.
- Ingham, L.M., Parker, M.L., Waldron, W., 1998. Peroxidase: changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiologia Plantarum* 102, 93-100.
- Jiang ZJ, ACS Woollard, SP Wolff, 1990. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Letters* 268:69-71.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition, CRC Press, Boca Raton, 365.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue, *Geoderma* 122, 143-149.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological Mechanisms, *Journal of Environmental Quality* 354, 265-277.
- Li, C., Feng, S, Shao, Y., Jiang, L., Lu, X., Hou, X., 2006. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings, *Journal of Environmental Sciences* 19, 725-732.
- Liang, Y., Chen, Q., Zhang, W., Gind, R., 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Plant Physiology* 160, 1157-1164.
- Martin, I., Bardos, P.A, 1996. A review of full scale treatment technologies for the remediation of contaminated land, Richmond Surrey: EPP Publications.
- Matos, J.X., Chávez Jr., W.X., Petersen, E.U., 2003. Iberian Pyrite Belt, Portugal & Spain, Society of Economic Geologists - Guidebook Environmental Geochemistry Field Course.

- Matos, J.X., Martins, L., 2006a. Iberian Pyrite Belt Mining Region – Regional Study of the Portuguese Sector, Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Prospeção de Minérios Metálicos, 34 pp.
- Matos, J.X., Martins, L.P., 2006b. Reabilitação ambiental de áreas mineiras do sector português da Faixa Piritosa Ibérica: estado da arte e perspectivas futuras, *Boletín Geológico y Minero*, 117 (2): 289-304.
- Matos, J.X., Pereira, Z., Oliveira, V., Oliveira, J.T., 2006. The geological setting of the São Domingos pyrite orebody, Iberian Pyrite Belt, VII Congresso Nacional de Geologia, Universidade de Évora.
- Matos, J.X., Soares, S., Cardoso, C., 2009. Geological-Geotechnical Characterization of the S. Domingos Mine Open Pit, Iberian Pyrite Belt In <http://geomuseu.ist.utl.pt>. Acedido a 30 de Novembro de 2012 em [http://geomuseu.ist.utl.pt/OG2009/Documentos%20Complementares/Congresso%20Geotecnia%20\(resumos\)/Congresso_Actas%20\(D\)/Volume%203/V3-10.pdf](http://geomuseu.ist.utl.pt/OG2009/Documentos%20Complementares/Congresso%20Geotecnia%20(resumos)/Congresso_Actas%20(D)/Volume%203/V3-10.pdf)
- Mench, M., 2005. Aided phytostabilization and mechanisms to reduce trace element bioavailability in contaminated soils. International Workshop – Current developments in remediation of contaminated lands. October 27-29, 2005 – IUNG, Pulawy, Poland. In: http://www.proland.iung.pulawy.pl/materials/wp6/day_1/02.pdf.
- Mendez, M.O., Glenn, E.P., Maier, R.M., 2007. Phytostabilization potencial of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal Environmental Quality* 36, 245-253.
- Mendez, M.O., Maier, R.M., 2008a. Phytoremediations of mine tailing in temperate and arid environments, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7, 47-59.
- Mendez, M.O., Maier, R.M., 2008b. Phytoremediations of mine tailing in arid and semiarid environments – An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* 116, 278-283.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation, *Chemosphere* 65, 1027-1039.
- Mokgalaka-Matlala, N.S., Flores-Tavizón, E., Castillo-Michel, H., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2008. Toxicity of arsenic (III) and (V) on plant growth, element uptake, and total amylolytic activity of mesquite (*Prosopis Juliflora* x *P. Velutina*). *International Journal of Phytoremediation* 10 (1), 47–60.
- Mourato, M.P., Martins, M.L.L., 2008. Plantas em meios contaminados por metais pesados. Ciclo de conferências – Uma aproximação à investigação, <http://www.uiqa.com.pt/>. Acedido a 16 de Março de 2013 em

- http://www.uiqa.com.pt/upload/MMourato_LLouroMartins.pdf Instituto Superior de Agronomia.
- Nuñez-Oliveira, E., Martínez-Abaigar, J.; Escudero, J.C., 1996. Adaptability of leaves of *Cistus ladanifer* to Widely Varying Environmental Conditions, *Functional Ecology* 10, 636-646.
- Odjegba, V.J., Fasidi, I.O., 2004. Accumulations of trace elements by *Pistia stratiotes*: Implications for phytoremediation, *Ecotoxicology* 13, 637-646.
- Okamura, M., 1980. An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta* 103, 259-268.
- Pang, J., Chan, G.S.Y., Zhang, J., Liang, J., Wong, M.H., 2003. Physiological aspects of vertiver grass for rehabilitation in abandoned metalliferous mine wastes, *Chemosphere* 52, 1559-1570.
- Pellet, D. M., Papernik, L. A., Jones, D. L., Darrah, P. R., Grunes, D. L., and Kochian, L. V., 1997. Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium tolerance in wheat, *Plant Soil* 63, 192.
- Pilon-Smits, A.E.h., Freeman, J.L., 2006. Environmental cleanup using plants: biotechnology advances and ecological considerations. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4, 203-210.
- Póvoas, I, Barral, M.F., 1992. Métodos de análise de solos, *Comunicações do Instituto de Investigação Científica Tropical, Série de Ciências Agrárias, Nº 10*, Ministério do Planeamento e da Administração do Território, Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Lisboa.
- Pratas, J., Prasad, M.N.V., Freitas, H., Conde, L., 2005. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation, *Journal of Chemical Exploration* 85, 99-107.
- Pulford, I. D.; Watson, C., 2003. Phytoremediation of Heavy Metal-contaminated Land by Trees, *Environment International* 29, 529-540.
- Ramos, S.J., Faquin, V., Ribeiro, C.R., Silva, C.A., Boldrin, P.F., 2009. Biomass production and phosphorus use of forage grasses fertilized with two phosphorus sources, *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33, 335-343.
- Ribeiro, H.M., 2011. Mineralização. Valorização Agronómica e Energética de Resíduos, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, pp 26.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P., Berlyn, G. P., 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153, 185-194.
- Ross, S.M., Kaye, M., 1994. *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, Wiley Publishers, Bristol. 469 pp.
- Saier Jr, M.H., Trevors, J.T., 2008. Phytoremediation, *Water, Air, Soil Pollution* 205, 61-63.

- Santos, E.S., 2007. Potencial de utilização de *Cistus ladanifer* L. na vegetalização de áreas mineiras. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve para obtenção do grau de mestre.
- Santos, E.S., Abreu, M.M., Nabais, C., Saraiva, J.A., 2009. Trace elements and activity of antioxidative enzymes in *Cistus ladanifer* L. growing on an abandoned mine area, *Ecotoxicology* 18, 860-868.
- Santos, E.S., Abreu, M.M., Macias, F., Anjos, C., Magalhães, M.C., de Varennes, A., 2010, Efeito de correctivos orgânicos e inorgânicos na recuperação de escomboreiras ricas em sulfuretos in: D. Flores e M. Marques (ed.), *Memórias* nº 14, pp. 1059-1065.
- Santos, E.S., Abreu, M.M., Macias, F., 2011. Importância do uso de tecnossolos na reabilitação de escomboreiras da área mineira de são domingos In <http://encontros.inuaf-studia.pt/>. Acedido a 30 de Julho de 2012 em <http://encontros.inuaf-studia.pt/II%20Seminario/Resumos/files/Importancia%20do%20uso.pdf>.
- Santos, E.S., Abreu, M.M., Nabais, C., Magalhães, M.C.F., 2012. Trace elements distribution in soils developed on gossan mine wastes and *Cistus ladanifer* L., tolerance and bioaccumulation, *Journal of Geochemical Exploration* 123, 45-51.
- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidante enzymes in growing rice seddlings. *Plant Science* 161, 1135-1144.
- Sinam, G., Sinha, S., Mallick, S., 2011. Effect of chromium on accumulation and antioxidants in *Cucumis utillissimus* L.: Response under enhanced bioavailibility condition, *Journal of Environmental Sciences* 23, 506-512.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil, *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 405-412.
- Smirnoff N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation*, Oxford: Bios Scientific Publishers, 217-243.
- Smirnoff, N., 1996. The function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants, *Annals of Botany* 78, 661-669.
- Srivastava, P.C., Gupta, U.C., 1996. *Trace Elements in Crop Production*. Science Publishers, Inc., USA.
- Telhada, A.E.L.B.M., 1988. Estudo da Bio-Ecologia de *Cistus ladanifer* L. (esteva) – Sua importância em Portugal, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Florestal Nacional.

- Tewari, A., Singh, R., Kumar, N., Rai, U.N., 2008. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals, *Bioresource Technology* 99, 8715-8721.
- Tlustos, P., Balik, J., Száková, J., and Pavliková, D., 1998. The accumulation of arsenic in radish biomass when different forms of As were applied in the soil, *Rostlinna. Vyroba*, 44, 7-13.
- UTAD – Jardim Botânico. *Cistus salviifolius*. In <http://jb.utad.pt>. Acedido a 9 de Agosto de 2013 em http://jb.utad.pt/especie/cistus_salvifolius
- Varenes, A., 2003. Produtividade dos Solos e Ambiente, Escolar Editora, Lisboa, 490;
- Vera, D.T., Martin, R.P., Oliva, S.R., 2010. Effect of chemical and physical treatments on seed germination of *Erica australis*, *Annales Botanici Fennici* 47, 353-360.
- Vera, D.T., 2011. Resposta de dos especies arbustivas (*Erica australis* y *Nerium oleander*) frente a la contaminación derivada de la actividad minera en Riotinto. Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Vegetal y Ecologia da Universidade de Sevilla para obtenção do grau de doutor.
- Warren, H. V., 1978. Biogeochemical prospecting for lead, in *The Biogeochemistry of Lead in the Environment*, Nriagu, J. O., Ed., Elsevier, Amsterdam, 395.
- Wood, P., 2001. Remediation methods for contaminated sites. In: Hester, R.E., Harrison, R.M. (Eds.), *Assessment and reclamation of contaminated land: Issues in environmental science and technology* 16, pp 115-139. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, pp 775–780.
- Wong, D.W.S., Whitaker, J.R., (2003). Catalase. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong D.W.S. (eds) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, pp 389-401.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants, *South African Journal of Botany* 76, pp 167-179.
- Yuan, Z.W., Jiang, T.J. 2003. Peroxidase: In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong D.W.S. (eds) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, pp 389-401.
- Zimdahl, R. L., 1975. Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources, paper presented at 68th Annu. Meeting of the Air Pollution Control Association, Boston, MA, June 15.